EIGNUNG DES HÜHNEREMBRYOTESTS FÜR DEN NACHWEIS VON MYKOTOXINEN

Johanna Behringer

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546016_0022

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten
der Tiere der Universität München
Vorstand: Professor Dr.A. Mayr

EIGNUNG DES HÜHNEREMBRYOTESTS FÜR DEN NACHWEIS VON MYKOTOXINEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
J o h a n n a B e h r i n g e r
aus München

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. J. Boessneck
Referent: Prof. Dr. B. Gedek
Korreferent: Prof. Dr. I. Gylstorff

Tag der Promotion: 11. Februar 1972

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Schrifttum	3
A.	Verbreitung von Mykotoxinen und deren Bildung durch ubiquitär vorkommende Schimmelpilze	3
B.	Eigenschaften starker Schimmelpilzgifte	5
1.	Aflatoxine	5
a)	Vorkommen	6
b)	Physikalisch-chemische Daten und dünnschichtchromatographischer Nachweis	7
c)	Wirkungen in vivo	10
2.	Ochratoxin A	17
a)	Vorkommen	17
b)	Physikalisch-chemische Daten und dünnschichtchromatographischer Nachweis	18
c)	Wirkungen in vivo	20
3.	Sterigmatocystin	22
a)	Vorkommen	22
b)	Physikalisch-chemische Daten und dünnschichtchromatographischer Nachweis	22
c)	Wirkungen in vivo	23
4.	Diacetoxyscirpenol	25
a)	Vorkommen	25

Seite

b) Physikalisch-chemische Daten und dünnschichtchromatographischer Nachweis 25
c) Wirkungen in vivo 27

5. Rubratoxine 29

a) Vorkommen 29
b) Physikalisch-chemische Daten und dünnschichtchromatographischer Nachweis 30
c) Wirkungen in vivo 30

6. Byssochlaminsäure 34

a) Vorkommen 34
b) Physikalisch-chemische Daten und dünnschichtchromatographischer Nachweis 35
c) Wirkungen in vivo 37

C. Biologische Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen 38

1. Mit Vielzellern oder deren Körperzellen 39

a) Hühnerembryonen 39
b) Entenküken 43
c) Laboratoriumstiere 45
d) Larven und Eier des Zebrafischs 46
e) Insekten 48
f) Kleinkrebse 51
g) Mollusken 52
h) Zellkulturen von menschlichen und tierischen Gewebe 53

2. Einzeller 55

a) Bakterien 55

Seite

b) Algen 57
c) Pilze 57
d) Protozoen 58

III. Eigene Untersuchungen mit Hilfe des Hühnerembryotests 59

A. Versuche mit gereinigten Mykotoxinen 59

1. Material und Methodik 59
2. Ergebnisse 62
3. Besprechung der Ergebnisse 67

B. Versuche mit Extrakten aus verpilzten Futtermischungen 72

1. Material und Methodik 72
2. Ergebnisse 78
3. Besprechung der Ergebnisse 78

IV. Zusammenfassung 80

V. Literaturverzeichnis 84

Lebenslauf

I. Einleitung

Agrarprodukte können Metaboliten des Stoffwechsels höherer Pflanzen enthalten, welche nach der Aufnahme in den Körper bei Mensch und Tier Krankheiten verursachen. Von ihnen sind vielfältige krankmachende Wirkungen beschrieben, die auf den hämo-, hepato-, nephro- und neurotoxischen sowie karzinogenen, teratogenen und östrogenen Eigenschaften solcher Naturstoffe beruhen (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1966). Durch neuere Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Mikrobiologie ist heute bekannt, daß auch bisher wenig beachtete Schimmelpilze derartige, Mensch und Tier auf gleiche Weise schädigende Naturstoffe bilden können. Diese reichern sich hauptsächlich unter ungünstigen Witterungsbedingungen entweder noch vor der Ernte oder erst später bei der Lagerung der Agrarprodukte in den von verderbniserregenden Pilzen befallenen Pflanzenteilen an (FORGACS, 1962; GEDEK, 1969 u.a.). Da sie auch noch in relativ kleinen Mengen in vivo Krankheiten (GOLDBLATT, 1969; GEDEK, 1969, 1971; GEDEK und HOFMANN, 1970 a und b) hervorrufen können, werden an die Nachweisverfahren besondere Anforderungen gestellt. Dabei hat sich gezeigt, daß die bisher für den Mykotoxinnachweis entwickelten physikalisch-chemischen Methoden oftmals zu wenig beweiskräftig sind und daß die für toxikologische Untersuchungen üblichen Laboratoriumstierarten wegen zu geringer Empfindlichkeit gegenüber kleiner Giftmengen als biologische Testobjekte nicht sehr geeignet sind (FRANK, 1968, 1969; GEDEK, unveröffentlicht; STOLOFF, 1971).

Es wurde mir deshalb die Aufgabe gestellt:

erstens zu untersuchen, ob im Hühnerembryotest ein Verfahren zur Verfügung steht, mit welchem der Nachweis der wich-

tigsten Mykotoxine von in Lebens- und Futtermitteln vorkommender Schimmelpilze gelingt,
zweitens festzustellen, ob dieser Test gegebenenfalls in der Anzeige anderen biologischen Nachweisverfahren für die Mykotoxine überlegen ist und
drittens zu prüfen, ob bei der Anwendung dieses Tests charakteristische Veränderungen an den Embryonen auftreten, die als spezifische Reaktionen gegenüber einem bestimmten Mykotoxin gewertet werden können.

II. Schrifttum

A. Verbreitung von Mykotoxinen und deren Bildung durch ubiquitär vorkommende Schimmelpilze

Als Mykotoxine werden diejenigen Stoffwechselprodukte von Pilzen angesprochen, welche auf alimentärem Weg bei Mensch und Tier Vergiftungserscheinungen mit tödlichem Ausgang hervorrufen (GEDEK, 1969).

Über die Abscheidung von für den Menschen schädlichen Stoffen aus Mikroorganismen hat ISRAEL (1878) erstmalig berichtet. Bereits 1891 wies SAKAKA darauf hin, daß der Genuß der mit Penicillium islandicum versetzten japanischen Reisspeisen Leberschädigungen hervorrufen kann. BODIN und GAUTIER erwähnten schon 1906 die hohe Thermoresistenz eines von Aspergillus fumigatus gebildeten und erst durch 30 Minuten langes Erhitzen auf 120 °C zerstörbaren Toxins.

Bis heute sind etwa 100 000 verschiedene Pilzarten in der Literatur beschrieben (FRANK, 1968 a), von denen ungefähr 80 nach dem derzeitigen Stand der Mykotoxinforschung als Mykotoxinbildner anzusprechen sind. Jedoch kennt man noch keineswegs von allen diesen Toxinbildnern die Giftstoffe ihrer chemischen Struktur nach. Dabei ist auffällig, daß anscheinend vornehmlich jene Pilze zur Toxinbildung befähigt sind, die ihrer systematischen Stellung nach zu den Fungi imperfecti gehören. Von ihnen ist nur die asexuelle Vermehrungsform bekannt. In ursächlichem Zusammenhang dürfte hiermit stehen, einerseits die größere Häufigkeit dieser Arten und andererseits die ausgeprägte Neigung dieser Pilze zur Variabilität auf Grund der bevorzugten Vermehrung auf ungeschlechtlichem Wege. Sie bringen auf diese Weise allgemein ungeheuere Mengen von Konidien her-

vor, die einen oder auch mehrere Zellkerne aufweisen. Zu den sich vornehmlich durch Konidien fortpflanzenden Fungi imperfecti zählen vor allem eine große Zahl verderbniserregender Schimmelpilze. Durch ihre ubiquitäre Verbreitung kommt ihnen als Vorratsschädlinge besondere Bedeutung zu.

Da Schimmelpilze gleicher Art- oder Gattungszugehörigkeit jedoch auch zu Fermentationszwecken, wie z.B. zur Bereitung bestimmter Käsesorten oder zur Synthese von Zitronensäure und Penicillin Verwendung finden, wird ihre weitere Verwendungsfähigkeit für technische Zwecke seit der Entdeckung, daß sie nicht nur für Mensch und Tier nützliche, sondern sogar schädliche Stoffe bilden können, unter einem Aspekt gesehen (FRANK, 1968 b).

Mit dem Vorkommen von Mykotoxinen ist nämlich überall dort zu rechnen, wo als Toxinbildner bekannt gewordene Pilze zu nennenswerter Entwicklung gekommen sind. Eine Infektionsmöglichkeit mit Sporen solcher Stämme ist für alle Produkte, die für die menschliche oder tierische Ernährung bestimmt sind, gleichermaßen gegeben, da die Mehrzahl der toxinbildenden Schimmelpilze über die ganze Erdoberfläche verbreitet vorkommt (GEDEK, 1969).

Die Toxinbildung findet im allgemeinen im Myzel statt, wobei der größere Teil des Toxins vom Pilz an das Nährsubstrat abgegeben wird. Als wesentlicher Faktor spielt dabei der Feuchtigkeitsgehalt des Substrates eine Rolle, weil er maßgeblich das Wachstum eines Toxinbildners und dessen Stoffwechsel reguliert. Die Wasseraktivität im Nährsubstrat muß wenigstens 10 % betragen (CHRISTENSEN, 1957). Die ebenfalls zur Sporenkeimung wichtige relative Luftfeuchtigkeit muß einen Wert von 70 - 90 % anzeigen. Hinsichtlich des Einflußes der Temperatur auf das Wachstum ist bekannt, daß Schimmelpilze in einem relativ weiten Bereich von 0 °C und

60 °C Vermehrung zeigen können, die Toxinbildung erfolgt aber oftmals nur bei ganz bestimmten Temperaturen.

SORENSEN et al. (1967) wiesen nach, daß einer der wichtigsten Toxinbildner Aspergillus flavus, das Aflatoxin unter 11 °C und über 37 °C nicht mehr produziert, obwohl der Pilz an sich sogar noch bei höheren Temperaturen als 37 °C wächst. Als Optimaltemperatur für die Aflatoxinbildung wurde 28 °C ermittelt. Für viele andere Mykotoxine von Schimmelpilzen steht der Nachweis hierfür noch aus. Das gilt auch für die Beeinflußung des Stoffwechselvorgänge in Gegenwart von Luft.

Die Wirkung verschiedener Gase auf das Toxinbildungsvermögen wurde erst bei Aspergillus flavus näher untersucht (LANDERS, DAVIS und DIENER, 1967).

B. Eigenschaften starker Schimmelpilzgifte

1. Aflatoxine

Unter den Schimmelpilzen ist Aspergillus flavus durch die Bildung stark toxischer Substanzen außerordentlich gefährlich. Diese besondere Gefährlichkeit zeigte sich 1960/61 erstmals nach einem Massensterben von Truthähnchen und Enten in England (BLOUNT, 1961).

1961 gelang es einem Team des "Central Veterinary Laboratory" in Weybridge unter SARGEANT aus verpilztem Futter neben vielen anderen Schimmelpilzen Aspergillus flavus zu isolieren, der eine toxische Substanz produzierte mit der man experimentell bei Truthühnern "Turkey X Disease" auslösen konnte. Die toxische Substanz wurde nach der Species Aflatoxin genannt.

Die Aspergillen gehören mit den Penicillien und einer Reihe von anderen Schimmelpilzgattungen zu denjenigen Fungi imperfecti, die sich asexuell durch Konidien und Sklerotien vermehren (FRANK, 1966; BÖSENBERG, 1970).

a) Vorkommen

Der als Giftbildner besonders bedeutungsvolle Aspergillus flavus LINK ist ein ubiquitär vorkommender Schimmelpilz. Die bekannteste und sicher wesentlichste Aflatoxinquelle stellen Erdnüsse und Erdnußprodukte dar. Lebensmittel werden sehr häufig durch diesen Toxinbildner befallen (LIE et al., 1967; FRANK, 1966, 1970; BULLERMAN et al., 1968, 1969; HANSSEN, 1968, 1969; BÖSENBERG und EBERHARDT, 1969; STRZELECKI, 1969). Auch Futtermittel werden, wie KÜHNERT und BUCHHEIM (1968), sowie SCHULTZ und MOTZ (1967) berichten, durch ihn mikrobiell verändert und mykotoxinhaltig. Da das Wachstumsoptimum des Pilzes etwa bei 30 °C und einer hohen relativen Luftfeuchtigkeit liegt, sind besonders tropische Produkte von ihm verseucht (BÖSENBERG, 1969; HESSELTINE, 1969).

Das Ausmaß der Toxinbildung hängt von der Temperatur, dem Feuchtigkeitsgrad des Milieus und von der Beschaffenheit des Substrates (befallen werden nur Nüsse mit beschädigter Schale) ab (DIENER und DAVIS, 1966; HESSELTINE, 1966).

Über eine Befähigung zur Toxinbildung verfügen aber nicht alle Stämme von Aspergillus flavus (TABER und SCHROEDER, 1967; SPENSLEY, 1963; MC DONALD und HORKNESS, 1964).

Nach Untersuchungen von DIENER et al. (1965) und JOFFE, (1969) sind etwa 80 % resp. 90 % aller Aspergillus flavus LINK-Stämme in der Lage, Aflatoxin zu synthetisieren. Es wird nicht nur von Aspergillus flavus LINK und verwandten

Aspergillus-Arten gebildet, sondern auch einige Stämme der Gattung Penicillium LINK sind hierzu in der Lage (SARGEANT et al., 1963; HODGES et al., 1964; SCOTT DE, 1965; KULIK und HOLADAY, 1966; PARRISH et al., 1966; RABIE et al., 1967; SCOTT et al., 1967; TABER und SCHROEDER, 1967; WALBEEK et al., 1968; WILSON et al., 1968; MISLIVEC et al., 1968; SCHROEDER und VERRETT, 1969).

b) Physikalisch-chemische Daten und dünnschichtchromatographischer Nachweis

Die Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2 waren die ersten Verbindungen, die aus mit Aspergillus flavus verpilzten Futtermitteln isoliert wurden. Die Buchstaben deuten die blaue und grüne Fluoreszenz der Verbindungen im UV-Licht an, die Indices ihre Reihenfolge im Dünnschichtchromatogramm in der Richtung der abnehmenden Rf-Werte (HARTLEY, 1963; NESBITT, 1962; LIJINSKY, 1966).

An der Aufklärung ihrer chemischen Struktur wurde gleichzeitig in mehreren Laboratorien gearbeitet (De IONGH et al., 1963; HARTLEY et al., 1963; VAN DORP et al., 1963; VAN DER MERWE et al., 1963). Sie konnte durch den Einsatz physikalisch-chemischer Methoden wie der UV-IR Fluoreszenz-Kernresonanz und Massenspektroskopie in kurzer Zeit durchgeführt und durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt werden (CHEUNG und SIM, 1964).

Das Grundgerüst der Aflatoxine ist ein Difurano-Kumarin. Die Aflatoxine B_2 und G_2 stellen die Dihydro-Varianten der Aflatoxine B_1 und G_1 dar. Die Molekularformeln für Aflatoxin B_1 und B_2 werden mit $C_{17}H_{12}O_6$ bzw. $C_{17}H_{14}O_6$, für das Aflatoxin G_1 mit $C_{17}H_{12}O_7$ und Aflatoxin G_2 mit $C_{17}H_{14}O_7$ angegeben.

Das Molekulargewicht der Aflatoxine ist mit Größen zwischen 312 und 330 verhältnismäßig klein. Eine Antikörperbildung ist deshalb nicht zu erwarten.

Die Schmelzpunkte der Toxine liegen zwischen 190 und 310 °C. Bei Erreichen dieser Temperatur zersetzt sich das Molekül.

Die Aflatoxine sind optisch aktiv. Der Drehwinkel liegt bei der Fraunhoferschen Linie je nach Toxin zwischen -260 und -582 (BÖSENBERG, 1970 b).

Die spektralanalytischen Daten der ersten vier Aflatoxine wurden von WOGAN (1966) in einer Tabelle zusammengefaßt, die hier wiedergegeben wird (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Zusammenfassung der spektralanalytischen Daten nach WOGAN (1966)

Aflatoxin	Ultraviolette Absorption (ε)		Infrarote Absorption (cm^{-1})				$CHCl_3$
	265 mμ	363 mμ					(Y max)
B_1	13400	21800	1760	1684	1632	1598	1562
B_2	9200	14700	1760	1685	1625	1600	
G_1	10000	16100	1760	1695	1630	1595	
G_2	11200	19300	1760	1694	1627	1597	

Die ultravioletten Absorptionsspektren der einzelnen Aflatoxin-Verbindungen sind sich sehr ähnlich, wobei jedes dieser Spektren bei 223, 265 und 362 mμ Maxima aufweist. Wegen der weitgehenden Übereinstimmung in der strukturellen Konfiguration verhalten sich auch die infraroten Absorptionsspektren von B_1, B_2, G_1 und G_2 kaum voneinander abweichend.

Alle vier werden bei einer Wellenlänge von 365 mμ zur Fluoreszenz angeregt, wobei das Maximum der Emission bei 425 mμ (B_1 und B_2) bzw. 450 mμ (G_1 und G_2) liegt (HARTLEY et al., 1963). Die Intensität der Emission ist bei den vier Substanzen verschieden. CARNAGHAN et al. (1963) zeigten, daß die relativen Fluoreszenzintensitäten in Methanol für B_1 - 0,5; B_2 - 4,0; G_1 - 2,5; G_2 - 6,5 betragen. In der Zwischenzeit wurden noch weitere Aflatoxinverbindungen isoliert. Die Derivate M_1 und M_2 stellen nach Beobachtungen von ALLCROFT et al. (1966), HOLZAPFEL et al. (1966) und CAMPBELL et al. (1970) Umwandlungsprodukte des Aflatoxin-vergifteten Organismus dar. Aflatoxin M_1 kann aber auch als natürliches Produkt vom Pilz selbst gebildet werden.

Die Aflatoxine B_{2a} und G_{2a} treten nach DUTTON und HEATHCOTE (1966) und POHLAND et al. (1968) im sauren Milieu älterer Aspergillus flavus Kulturen auf. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die stark toxischen Aflatoxine B_1 und G_1 durch Dehydration dieser Toxine gebildet werden. DUTTON und HEATHCOTE (1966) gelang die Isolierung dieser Aflatoxin-Derivate im Labor.

DALEZIOS et al. (1971) berichteten über ein Phenolderivat von Aflatoxin B_1, das sie aus dem Urin von Affen isolierten. Das neue Aflatoxinstoffwechselprodukt erhielt die Bezeichnung Aflatoxin P_1.

Noch ungeklärt ist das Verhalten der Abkömmlinge, die auf den aflatoxinhaltigen Nahrungs- und Futtermitteln entstehen können oder durch den Umbau im Organismus gebildet werden. Bisher sind lediglich die Aflatoxine M_1 und M_2, welche ähnliche Wirkungen in vivo zeigen wie die Aflatoxine B_1 und G_1, näher untersucht worden (HOLZAPFEL et al., 1966; De IONGH et al., 1964).

Seit der Entdeckung der Aflatoxine sind zahlreiche Analysen-

verfahren entwickelt worden, die dem Nachweis dieser gefürchteten Gifte vor allem in Agrarprodukten dienen sollen. Alle bisher hierfür entwickelten physikalisch- chemischen Verfahren laufen letztlich auf eine Bewertung im Dünnschichtchromatogramm (DC) unter langwelligem UV-Licht hinaus, wobei man sich die hervorragende Fluoreszenz der Aflatoxine zunutze macht (HARTLEY et al., 1963; VAN DORP et al., 1963; NESHEIM, 1964; CAMPBELL und FUNKHOUSER, 1966; STEYN, 1969; FISHBEIN und FALK, 1970). De IONGH (1965) veranschlagte die Nachweisgrenze derartiger Verfahren mit 0,0005 µg B_1. SCHULLER et al. (1970) bestimmten Aflatoxin B_1 durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie in Kombination mit fluorodensitometrischer Auswertung.

FRANK und EYRICH (1968) verwiesen auf aflatoxinvortäuschende Substanzen. Zur Vermeidung von Fehlbeurteilungen wird die Verwendung mehrerer Fließmittel-Systeme empfohlen.

c) Wirkungen in vivo

Nach BANES (1966) rechnen die Aflatoxine zu den stärksten Zellgiften. Sie werden als die am stärksten karzinogen wirkenden Stoffe bezeichnet, da die Tagesdosis zur Auslösung eines Leberkarzinoms bei Ratten um das Tausendfache niedriger als entsprechende Dosen anderer kanzerogener Stoffe (z.B. Buttergelb) liegt.

Die Wirkung der Aflatoxine auf den lebenden Organismus kann sowohl in der Intensität als auch in der Art der Schädigung sehr unterschiedlich sein. Je nach Art des Toxins hängt sie von der Tierart, deren Rasse, Alter und Ernährungsweise sowie von der Art der Aufnahme des Giftstoffes in den Körper (BÖSENBERG, 1970 b) ab. Eklatante Unterschiede in der Aflatoxin-Wirkung in Beziehung zur Proteinzufuhr sahen MADHAVAN et al. (1965). Bei erhöhter Eiweißaufnahme

war eine Abnahme der toxischen Wirkung zu verzeichnen. Auf Grund der zentralen Stellung der Leber im Gesamtstoffwechsel ist die Leber oft das am stärksten betroffene Organ (BÖSENBERG, 1970 a; BUTLER, 1970). Neben Leberschäden sind gelegentlich auch Nierenschäden festgestellt worden. Nierenadenome und Pyelonephritis ähnliche Zustände konnten bei Tieren, die gleichzeitig Lebertumoren entwickelt hatten, beobachtet werden (NEWBERNE et al., 1964). Von ARMBRECHT et al. (1964, 1965) und MADHAVAN (1965) werden jedoch diese Veränderungen, die bei ihren Experimenten ausblieben, auf zusätzliche Stoffe in der Nahrung der Versuchstiere zurückgeführt. Andere Toxine des Schimmelpilzes, wie z.B. das von RODRICKS et al. (1968) entdeckte Aspertoxin, können hier mitgewirkt haben.

Aflatoxin B_1 zeigt eine Wirkung bei einer großen Anzahl von Tieren. Bei verschiedenen Tierarten sind sowohl akute toxische Wirkungen an der Leber als auch chronische Veränderungen beobachtet worden. Tabelle 2 gibt darüber näher Aufschluß.

Bei Berücksichtigung der Höhe der Dosis, die im Tierkörper zu akuter Wirkung führt, läßt sich nach SCHOENTAL (1967) folgende Unterteilung treffen:

erstens — sehr empfindliche Species (LD_{50} 1 mg/kg KGW oder weniger) = Entenküken, Regenbogenforelle, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund, neugeborene Ratte, Truthahn;

zweitens — empfindliche Species (LD_{50} bis zehnmal höher) = Schwein, Ratte, Affe, Kalb, Fasan, Frettchen, Goldhamster, Rind, Nerz, Wachtel, Silberlachs;

drittens — resistent (verträgt relativ große Dosen ohne Krankheitserscheinungen) = Maus, Schaf.

Die besondere Bedeutung der Aflatoxine wurde erkannt, als sich herausstellte, daß auch teratogene Schäden bei Säugetieren auftreten. Diese konnten bei Ratten (BUTLER, 1966;

Tabelle 2: Nachweis von Leberveränderungen durch Aflatoxin B_1 bei verschiedenen Tierarten

Tierart	Veränderungen akut	Veränderungen chronisch Leberfibrose	Veränderungen chronisch Tumorbildung	Autoren
Rind	+	+	-	LOOSMORE und MARKSON, 1961 CLEGG und BRYSON, 1962 ELIS und DIPAOLO, 1967
Schwein	+	-	-	BAILEY und GROTH, 1959 HARDING et al., 1963 ANNAU et al., 1964
Schaf	+	-	-	NABNEY et al., 1966 NEWBERNE, und BUTLER, 1969
Hund	+	-	-	BAILEY und GROTH, 1959 CHAFFEE et al., 1969
Ratte	+	+	+	SCHOENTAL, 1961 BUTLER, 1964 SHANK und WOGAN, 1966 CLIFFORD und REES, 1967 NEWBERNE et al., 1966

Fortsetzung Tabelle 2:

Tierart	Veränderungen akut	chronisch Leberfibrose	chronisch Tumorbildung	Autoren
Ratte	+	+	+	CARNAGHAN, 1967 LEE et al., 1969
Meerschweinchen	+	-		BUTLER und BARNES, 1963
Geflügel	+	+		ASPLIN und CARNAGHAN, 1961 ALLCROFT et al., 1963 GUMBMANN et al., 1970 SMITH und HAMILTON, 1970
Forelle	-	-	+	ASHLEY et al., 1965 SINNHUBER et al., 1965 WUNDER und OTTO, 1969
Affe	+	+		MADHAVAN et al., 1965 FOY et al., 1966 SVOBODA et al., 1967 ALPERT et al., 1970

FRAYSSINET, 1966; DI PAOLO, 1967), Hamstern (ELIS et al., 1967 DI PAOLO, 1967) und Mäusen (DI PAOLO et al., 1967) nachgewiesen werden. Zur Auslösung teratogener Schäden waren Toxinmengen nötig, die unterhalb der für nicht tragenden Tiere toxischen Dosis liegen. Nach Verabreichung des Toxins starben die Foeten entweder ab, oder sie wiesen später Mißbildungen auf. Die Auslösung von Chromosomen-Aberrationen bei der Pflanze Vicia faba (LILLY, 1965) und bei menschlichen Leukozyten (DOLIMPIO, 1968) können als Zeichen mutagener Eigenschaften der Aflatoxine gedeutet werden. LEGATOR (1969) beobachtete tödliche Mutationen bei Mäusen. ONG (1970) studierte den mutagenen Effekt von Aflatoxinen an dem genetischen Testobjekt Neurospora crassa. 200 mal mehr Adenin- 3 -Mutanten als bei Spontanmutationen traten während der Züchtung mit dem Zusatz von 40 µg Aflatoxin B_1 pro ml Nährmedium in Konidien von Neurospora crassa auf.

Eine antineoplastische Aktivität des Aflatoxin B_1 bei der Übertragung von Tumoren auf Ratten konnte erstaunlicherweise auch nachgewiesen werden (GREEN, 1968). Nach BUTLER und BARNES (1966) übt Aflatoxin B_1 den karzinogenen Reiz lokal aus. Sie stellten bei Ratten während oralen Belastungsversuchen über längere Zeit Magenkarzinome und einmal auch Rektumkarzinom fest.

DICKENS und JONES (1963) beschrieben die Entstehung von Sarkomen beim Tier an Stellen des Körpers, an denen die Injektion des Toxins erfolgte.

WEI et al. (1970) gelang der Nachweis der Absorption von Aflatoxin B_1 durch die Rattenhaut. Die toxische Leberwirkung nach der Hautbepinselung entsprach den gefundenen Verhältnissen nach oraler oder intraperitonealer Verabreichung. Da auch hier die Leber das am meisten geschädigte Organ war und sich keinerlei Veränderungen auf der mit Toxin bepinselten Haut zeigten, leiten die Autoren davon eine Organ-

spezifität des Aflatoxin B_1 ab.

Dagegen traten bei Versuchen von JOFFE und UNGAR (1969) bereits 24 Stunden nach Aflatoxinapplikation auf der rasierten Kaninchenhaut Hautveränderungen auf. UNGAR und JOFFE (1969) erhielten jedoch auch 48 Stunden nach der Bepinselung verschiedener Hautstellen mit Aflatoxin B_1 (1,4 mg/kg bis 10 mg/kg) beim Kaninchen zentrolobuläre fettige Veränderungen und eine hyaline Nekrose der Leberzellen. Außerdem war das Glykogen vermindert und nur in der Umgebung der Lebervenen nachzuweisen. Es besteht kein Zweifel daran, daß das Aflatoxin B_1 selbst das toxische Molekül darstellt und daß es nicht, wie so viele andere Substanzen, erst durch Enzyme des tierischen Organismus in ein solches umgewandelt werden muß (BARNES, 1970).

Die Vermutung, daß das Aflatoxin B_1 mit dem Blutstrom an die Organe herangeführt wird, bestätigten Untersuchungen von RAO et al. (1968). Es wurde nachgewiesen, daß das Aflatoxin B_1 an das Plasmaalbumin gebunden wird, was durch eine blaue Fluoreszenz in der Zone des korrespondierenden Plasmaalbumins angezeigt wird, wenn das Elektrophoretogramm unter UV- Licht betrachtet wird.

In mikrobiologisch ausgerichteten klinischen Studien im Hinblick auf die Beteiligung von Mykotoxinen bei proliferativen und aplastischen Blutkrankheiten kam man zu dem Ergebnis, daß Mykotoxine als auslösende Faktoren in Betracht kommen können. ALEKSANDROWICZ et al. (1970) wiesen nämlich in den Wohnungen von an Leukämie leidenden Patienten unter anderen Pilzen auch Aspergillus flavus nach.

SAVEL et al. (1970) nahmen auf Grund ihrer Untersuchungsergebnisse an, daß periphere Blutlymphozyten des Menschen die gleiche Empfindlichkeit gegenüber Aflatoxin B_1 wie menschliche Leberembryozellen besitzen. Außerdem scheint

Aflatoxin B_1 eine Stufe des Vorganges der antigenen und phytohaemagglutininen Stimulation zu blockieren. Der immunsuppressive Effekt des Aflatoxin B_1 konnte damit bekräftigt werden.

Als weitere Eigenschaft schreibt BABUNMI (1969) dem Aflatoxin B_1 eine antikoagulierende Wirkung zu und teilt die Beobachtung einer Verlängerung der Blutgerinnungszeit bei Ratten mit.

Bei Untersuchungen über die metabolischen Wirkungen des Aflatoxin B_1 stellten RAJ et al. (1970) im Organismus von Eintagsküken ein leichtes Ansteigen des Blutglucosespiegels fest. Dieses Ergebnis spricht entweder für eine Beeinträchtigung der Glucoseaufnahme oder für einen verminderten Bedarf des Gewebes an Glucose in Anwesenheit des Toxins.

Andere Arbeitsgruppen arbeiteten an der Aufklärung der Art und Weise, in welcher das Aflatoxin B_1 in den Stoffwechsel der Vergifteten eingreift. Erste Befunde führten zu der Annahme einer Hemmung der Eiweißsynthese.

SMITH (1963) konnte bei Untersuchungen über den Einbau von C^{14}-markiertem Leucin eine Eiweißsynthesehemmung in Gegenwart von Aflatoxin B_1 beobachten. Demgegenüber stellten SHANK und WOGAN (1966) fest, daß die auf das Toxin zurückzuführenden Störungen in der Eiweißsynthese nur vorübergehend auftreten würden, und daß auf diese eine Periode der Stimulation folgen würde. Bei dieser Art des Eingriffs des Toxins in den Zellstoffwechsel halten sie eher eine Beeinträchtigung des Transportsystems als die direkte Schädigung des Synthesesystems für möglich.

REISS (1969) faßte die neuesten Forschungsergebnisse dahingehend zusammen:

erstens das Toxin dringt in die Zelle und weiter in den Kern ein,

zweitens hier verbindet es sich mit der DNS und hemmt dabei die RNS-Polymerase,

drittens dadurch wird die Synthese von RNS vermindert und damit auch die Aktivität der messenger-RNS herabgesetzt,

viertens die Folge davon ist eine stark reduzierte Proteinsynthese, die sich unter anderem in einer Verminderung der Aktivität gewisser Enzyme äußert.

Ungeklärt ist bis heute noch, inwieweit diese Vorgänge für die Entstehung von Krebsgeschwülsten verantwortlich zu machen sind.

Weitere Wirkungen der Aflatoxine auf die Zelle und der Beeinträchtigung ihrer Lebensäußerungen werden von der Pflanze mitgeteilt (KOEHLER und WOODWORTH, 1938; SCHOENTAL und WHITE, 1965; EL-KHADEM et al., 1966; LILLY, 1965; BLACK und ALTSCHUL, 1965). Auf sie soll nicht näher eingegangen werden, da sie zum großen Teil keine Rückschlüsse auf die Vorgänge im menschlichen oder tierischen Organismus zulassen.

Erwähnt sei hier nur noch, daß Aflatoxine auch gegenüber Einzellern toxisch wirken, was teilweise für biologische Nachweisverfahren ausgenützt wird (vgl.S. 55).

2. Ochratoxin A

a) Vorkommen

Toxische Substanzen des Aspergillus ochraceus WILH. wurden in Südafrika aus Getreide, Leguminosen, fermentierten Fischpräparaten und anderen Lebensmitteln isoliert (SCOTT, 1965; CHRISTENSEN, 1967; KURATA, 1967; VAN WALBEEK, 1968; SHOTWEIL, 1969). Aus Aspergillus ochraceus WILH. gewannen 1965 VAN DER

MERWE und Mitarbeiter die Ochratoxine A, B und C.

Von LAI et al. (1968) wird berichtet, daß außer Aspergillus ochraceus WILH. auch die Aspergillen, A. melleus, YUKAWA, A. sulphreus (FRES.) THOM et CHURCH, in der Lage sind, gleichartige Stoffe zu produzieren.

VAN WALBEEK et al. (1969) entdeckten einen Penicillium-Stamm, nämlich Penicillium viridicatum WESTLING, der Ochratoxin A bildet. Das Vorkommen von Ochratoxin produzierenden Stämmen innerhalb der Gruppe Aspergillus ochraceus ist nach Berichten von NESHEIM (1967) und LAI et al. (1968) gering. NESHEIM (1967) isolierte aus 14 Stämmen und LAI et al. (1968) aus 34 Stämmen jeweils vier Ochratoxinbildner.

b) Physikalisch-chemische Daten und dünnschichtchromatographischer Nachweis

STARON, ALLARD, NYUGEN DAT XUONG und Mitarbeiter (1965) gewannen drei toxische Substanzen aus Aspergillus ochraceus Kulturen.

1) Eine Substanz mit dem Molekulargewicht 187, C (80,51 %), H (11,18 %), O (8,31 %) und einem Schmelzpunkt bei 160 °C. Im ultravioletten Absorptionsspektrum ergab sich in ihrer Gegenwart bei 272 mμ ein Peak.
2) Eine zweite Substanz mit dem Molekulargewicht 276, C (69 %), H (7 %), O (25 %). Für diese Substanz ergaben sich Peaks bei 230 mμ, 300 mμ und 392 mμ.
3) Eine dritte Substanz mit dem Molekulargewicht 341, C (68 %), H (7,5 %),O (24,5 %). Das ultraviolette Absorptionsspektrum wies bei 225 mμ und bei 322 mμ Maxima auf.

Es handelt sich hierbei wiederum wie bei den Aflatoxinen um Kumarinabkömmlinge.

Von diesen stellt Ochratoxin A, $C_{20}H_{18}ClNO_6$, ein Amid des Phenylalanins mit einem substituierten Chloroisokumarin dar. Es kann durch Extraktion mit Methanol, Chloroform und wässrigem Natriumbikarbonat auf dem Wege über die Chromatographie mit neutraler Kieselsäure sowie Ionenaustauschchromatographie mit "Dowex 1" isoliert werden (VAN DER MERWE et al., 1965 b).

Ochratoxin B, $C_{20}H_{19}NO_6$, und Ochratoxin C, $C_{22}H_{22}ClNO_6$, sind dagegen die Dechloro- bzw. Äthylesterverbindungen des Ochratoxins A (VAN DER MERWE et al., 1965 a). Durch Synthese konnte die Struktur von Ochratoxin A bestätigt werden (STEYN, 1967; ROBERTS, 1970).

SEARCY und Mitarbeiter (1969) erforschten die Biosynthese von Ochratoxin A mit Hilfe radioaktiver Stoffe. Phenylalanin 1 - ^{14}C und Natrium-Acetat 2 - ^{14}C wurden dem Pilz in einem Saccharose-Hefeextrakt-Medium zugeführt. Die Ergebnisse zeigten, daß das Phenylalanin unverändert dem Phenylalaninanteil des Ochratoxin A einverleibt wird, während die übrige Isokumarin-Hälfte des Ochratoxin A-Moleküls ihre Entstehung einer Acetat-Kondensation verdankt. Von den drei Stoffwechselprodukten des Aspergillus ochraceus scheint das Ochratoxin A in vivo am stärksten toxisch zu wirken, weshalb die entwickelten Nachweisverfahren vornehmlich auf dieses Toxin ausgerichtet sind. Das Ochratoxin A zeichnet sich wie das Aflatoxin B_1 durch fluoreszierende Eigenschaften aus.

Es läßt sich leicht dünnschichtchromatographisch (DC) nachweisen, da es eine auffällige gelbgrüne Fluoreszenz bei 350 nm zeigt. Beim Besprühen mit $FeCl_3$ entwickelt sich eine rot-braune Farbe (STEYN, 1969). STEYN und VAN DER MERWE (1966) benutzten die dünnschichtchromatographische Methode, um Ochratoxin A in schimmeligem Material nachzuweisen. Bei ihrer Messung wurde die Größe der fluoreszie-

renden Flecken mit dem eines Standard-Ochratoxin A Fleck verglichen.

SCOTT und HAND (1967), EPPLEY (1968), CAMPBELL (1968) und FISHBEIN (1970) beschrieben ebenfalls Nachweismethoden für Ochratoxin A, die im wesentlichen auf dem gleichen Prinzip beruhen.

Die Wirkung einiger Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen, die einem halbsynthetischen Medium zugefügt wurden, auf die Ochratoxin A-Produktion von Aspergillus flavus wurde von FERREIRA (1967) sowie von DAVIS und Mitarbeitern (1969) mitgeteilt.

c) Wirkungen in vivo

Ochratoxin A steht seiner akuten Toxizität nach kaum hinter Aflatoxin B_1 zurück. Ausgeprägte Leberveränderungen als Folge einer Vergiftung mit diesem Toxin treten auch hier gegenüber Schädigungen anderer Organe in den Vordergrund.

Sowohl das isolierte Toxin als auch das Futter, das mit den Toxin produzierenden Stämmen des Pilzes angereichert war, erwies sich als stark toxisch für Versuchstiere (THERON, 1966; CHRISTENSEN und KAUFMANN, 1969). Eine einzige Dosis von nur 100 µg, die mittels Magensonde Eintagsentenküken oder abgesetzten männlichen Wistar-Ratten verabreicht worden war genügte, um bei diesen Tieren Leberveränderungen hervorzurufen (THERON, 1966). Bei Eintagsentenküken wurden eine fettige Infiltration der Leberparenchymzellen, bei Ratten eine diffuse hyaline Degeneration der Leberzellen, verbunden mit Herdnekrose beobachtet. Elektronenmikroskopisch konnten Veränderungen in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum festgestellt werden.

Die Hepatoxizität des Ochratoxin A wurde von DOUPNIK und

PECKHAM (1969, 1970) auch bei Hühnerküken nachgewiesen. Die LD_{50} für männliche Ratten beträgt bei oraler Verabreichung nach PURCHASE und NEL (1968) 22 mg/kg. Der LD_{50}-Wert liegt für Eintagsentenküken dagegen nach PURCHASE (1967) bei 150 µg pro Tier. Ochratoxin A ruft bei der Ratte nach Beobachtungen dieser Autoren Enteritis, Nierennekrose und ein Sinken des Leberglykogens hervor.

MOORE und TRUELOVE (1970) stellten eine völlige Respirationshemmung von Rattenlebermitochondrien bei der Zugabe geringer Ochratoxin A-Konzentrationen fest.

Extrakte aus einem mit Penicillium viridicatum bewachsenen Medium, erwiesen sich beim Kaninchen im Dermaltest als toxisch (JOFFE, 1960). CARLTON et al. (1968) fanden, daß Penicillium viridicatum bei Mäusen die höchste Toxizität entfaltet. Das steht z.B. im Gegensatz zu den Befunden beim Aflatoxin B_1, welches sich bei der Maus als weniger toxisch erwies im Vergleich zu anderen Tierarten (SCHOENTAL, 1967). Das bezieht sich jedoch nur auf die akute Toxizität von Aflatoxin B_1, nicht auf seine karzinogene Wirkung bei Mäusen (DICKENS und JONES, 1965).

Nach STEYN et al. (1967) ist die Toxizität des Aspergillus ochraceus den Chlor enthaltenden Komponenten der Stoffwechselprodukte zuzuschreiben.

In relativ kleinen Mengen von 1 - 2 µg übt Ochratoxin A auch eine toxische Wirkung gegenüber Mikroorganismen aus (BROCE et al., 1970).

3. Sterigmatocystin

a) Vorkommen

Sterigmatocystin gewann als toxischer Bestandteil in Lebensmitteln und in Futtermitteln während der letzten fünf Jahre große Bedeutung. Es wurde zuerst nur von Kulturen des Pilzes Aspergillus versicolor TIRABOSCHI isoliert (DAVIS, 1960; BULLOCK, 1962). HOLZAPFEL und Mitarbeiter (1966) fanden später zwei weitere Arten, Aspergillus nidulans WINT und BIPOLARIS sp., die in der Lage waren, Sterigmatocystin zu synthetisieren.

b) Physikalisch-chemische Daten und dünnschichtchromatographischer Nachweis

Die bei den Aflatoxinen vorhandene Bifuranstruktur ist auch beim Sterigmatocystin nachgewiesen worden (BULLOCK et al., 1962). Die Formel dieses Toxins lautet nach BIRKINSHAW und HAMMADY (1957) $C_{18}H_{12}O_6$. Die Verbindung zerfällt bei 246 °C.

Der physikalisch-chemische Nachweis kann auch hier wieder, ähnlich wie bei den Aflatoxinen, auf dünnschichtchromatographischem Weg erfolgen (HOLZAPFEL et al., 1966). FISHBEIN und FALK (1970) beschrieben eine dünnschichtchromatographische Methode zur Bestimmung des Sterigmatocystin, bei welcher mit 2 % Methanol in Chloroform als Fließmittel gearbeitet wird. Nach erfolgter Entwicklung erscheint das Toxin im UV-Licht auf der Chromatoplatte als ziegelroter fluoreszierender Fleck (Rf-Wert 0,8). Die Fluoreszenz ist aber im Vergleich zum Verhalten der anderen Mykotoxine nur sehr schwach und ist bei der Auftrennung eines unreinen Extraktes aus Getreide, besonders wenn er von Sorghum stammt, manchmal durch einige ebenfalls rotfluoreszierende Stoffe schwer zu entdecken. Die geringste Menge, die auf

diese Weise von Sterigmatocystin noch nachgewiesen werden kann, liegt bei einer Menge von 0,4 µg. Damit ist die Methode eintausendstel geringer empfindlich als die gleichartigen Verfahren für die Bestimmung der Aflatoxine. Beim Besprühen mit den Farbreagentien Schwefelsäure und Eisenchlorid soll jedoch eine grün-graue bzw. eine grüne Farbe entstehen, wodurch in unklaren Fällen das dünnschichtchromatographische Testergebnis abgesichert werden kann (STEYN, 1969).

c) Wirkungen in vivo

In vivo verhält sich das Sterigmatocystin ähnlich den Aflatoxinen. Es zeichnet sich neben allgemeinen toxischen Eigenschaften auch durch karzinogene Wirksamkeit aus (HOLZAPFEL et al., 1966). Subcutane Injektionen des Sterigmatocystin riefen bei der Ratte an der Impfstelle Sarkome hervor. Nach einer einmaligen oralen oder intraperitonealen Applikation des Toxins traten bei der gleichen Tierart Leber- und Nierennekrosen auf. Die Autoren führen ferner an, daß für das Sterigmatocystin, obwohl die LD_{50} nur um das sechsfache höher liegt als der für Aflatoxin B_1 bei der Ratte ermittelte Wert, eine 200-fache geringere karzinogene Wirkung im Vergleich zum Aflatoxin B_1 bei subcutaner Injektion zu verzeichnen war.

Bei an Wistar-Ratten von PURCHASE und VAN DER WATT (1968) durchgeführten Versuchen wiesen die Autoren bei Sterigmatocystin hepatokarzinogene Eigenschaften nach. Nach Gaben von kristallinem Aflatoxin B_1 (105 ug/Woche per os) an Ratten, konnte PURCHASE (1966) innerhalb von 18 Monaten bei den damit behandelten Tieren Hepatome hervorrufen und somit indirekt den Nachweis führen, daß das Aflatoxin B_1 bei oraler Verabreichung zehnmal stärker karzinogen wirkt als

das ebenfalls Leberkrebs erzeugende Sterigmatocystin. Als LD_{50}-Wert werden bei oraler Verabreichung von PURCHASE und VAN DER WATT (1969) für die männliche Ratte 166 mg, für die weibliche Ratte 120 mg Sterigmatocystin pro kg Körpergewicht angegeben. Bei dieser Belastung ergab die Autopsie der Tiere Nekrosen in Leber und Niere. Es zeigte sich ferner, daß die Lokalisation beim Auftreten von Lebernekrosen durch Sterigmatocystin entsprechend der Art der Applikation des Giftes verschieden sein kann und zwar zentrolobulär nach oraler Verabreichung und periportal nach intraperitonealer Injektion.

Massive Haemorrhagien und ausgeprägte Nekrosen der Nierenkanälchen und Glomeruli traten bei Dosen von 144 mg/kg Körpergewicht auf; ebenso waren bei geringen Dosierungen z.B. von 10 - 100 mg/kg Körpergewicht degenerative Veränderungen, einhergehend mit Nekrosen, zu verzeichnen. Der Grad der Nierenschädigung zeigte keine Beziehung zur Art der Verabreichung des Toxins. Subakute Leberaffektionen durch Sterigmatocystin beschrieb bei Wistar-Ratten VAN DER WATT (1970). Er beobachtete, daß einer Hyperplasie eine starke hepatocelluläre Nekrose vorausgeht.

Auf eine akute Toxizität des Sterigmatocystin zurückzuführende Effekte manifestierten sich bei Affen ebenfalls hauptsächlich im Bereich der Leber und der Niere (VAN DER WATT, 1970). Die LD_{50} liegt um das Zehnfache höher als die des Aflatoxin B_1 für Affen und ist um die Hälfte kleiner als die LD_{50} des Aflatoxin B_1 für Ratten.

Die toxischen Eigenschaften des Sterigmatocystins sind auch in der Wirkung auf embryonale Affennierenepithelzellen ablesbar (ENGELBRECHT, 1970). Verlust der Chromatinsubstanz des Kernes und eine fortschreitende Zelldegeneration, Verhinderung der Mitose, Kernbrüche und eine Bildung von eosinophilen Kernmassen wurden festgestellt.

Wenn Zellen 24 Stunden lang einer Toxinkonzentration von 0,01 µg/ml Sterigmatocystin ausgesetzt werden, wurde die Mitose teilweise gehemmt. Unter dem Einfluß einer 48-stündigen Einwirkungszeit und höheren Toxindosen wurde dagegen vollständige Mitosehemmung erreicht.

Im Vergleich zu den Aflatoxinen B_1 und G_1, sowie zum Ochratoxin A wirkt das Sterigmatocystin nur wenig toxisch gegenüber Mikroorganismen. Bei Bakterien und Pilzen konnte in Konzentrationen von $\leq$ 100 µg/ml kein wachstumshemmender Effekt nachgewiesen werden (LILLEHOJ und CIEGLER, 1968).

4. Diacetoxyscirpenol

a) Vorkommen

Schimmelerzeugende Fusariumarten sind neben Aspergillen und Penicillien häufige Verderber von Getreide (BAMBURG, 1969). Dabei kann Diacetoxyscirpenol als eines der toxischen Stoffwechselprodukte von Pilzen dieser Gattung entstehen (SIGG, 1965). Es wurde erstmals von BRIAN et al. (1961) bei den Species Fusarium scirpi var. acuminatum (ELLIS et EVERH.) WOLL., Fusarium equiseti (CDA.) SACC. und Gibberella intricans WOLL. nachgewiesen. In Kulturen von Fusarium avenaceum SACC. und Fusarium bactridioides WOLL. und Fusarium tricinctum (CDA.) SACC. wurde es in geringer Menge festgestellt.

b) Physikalisch-chemische Daten und dünnschichtchromatographischer Nachweis

Als chemische Verbindung wurde Diacetoxyscirpenol (4,15 Diacetoxyscirp-9-en-3-ol) von FLURY et al. (1965), DAWKINS et al. (1965) und DAWKINS (1966) beschrieben. Es stellt einen

optisch aktiven tetracyclischen Diacetoxyalkohol mit der Summenformel $C_{19}H_{26}O_7$ dar; der Schmelzpunkt liegt bei 161,2 °C.

Da man aus Kulturen von Fusarienarten Diacetoxyscirpenol in einer Menge bis zu 125 mg/ml Nährmedium gewinnen konnte, interessierte das natürliche Vorkommen dieses Stoffes in mit Fusarien befallenen Pflanzen und Futtermitteln und gab Veranlassung zur Entwicklung von Nachweisverfahren für die Routine (SCOTT, 1969).

Diacetoxyscirpenol ist nach GILGAN et al (1966) wie die anderen bereits erwähnten Mykotoxine auch auf dünnschichtchromatographischem Wege nach Besprühen der Chromatoplatte mit konzentrierter Schwefelsäure nachweisbar.

Auch STEYN (1969) konnte auf Kieselgel G-Platten (Merck, 0,25 mm Schichtdicke), die mit Oxalsäure imprägniert waren, Diacetoxyscirpenol nachweisen. Auf die Chromatoplatten wurde hierbei Diacetoxyscirpenol in einer Chloroform-Methanol-Lösung (1:1) aufgetragen und die Entwicklung bis 14 cm Höhe von der Auftragslinie in der Kammer mit einem Fließmittel, bestehend aus Chloroform-Methylisobutylketon im Verhältnis 4:1 vorgenommen. Bei anschließender Betrachtung des Chromatogramms im ultravioletten Licht (366 mμ) und nach Besprühen mit Farbreagentien kann die Beurteilung erfolgen. Nach dem Besprühen ist aber noch ein zehn Minuten langes Erhitzen bei ca. 110 °C erforderlich. Diacetoxyscirpenol soll durch das Besprühen mit Schwefelsäure eine bleigrüne Farbe annehmen. Der Rf-Wert (x 100) wird von STEYN (1969) mit 28 angegeben.

c) Wirkungen in vivo

YATES (1969) brachte das Auftreten von Fusarium tricinctum mit einer Schwingelgrasvergiftung in Zusammenhang, die bei Tieren sporadisch und jahreszeitlich bedingt vorkommt.

Diacetoxyscirpenol entfaltet ebenfalls im tierischen Organismus eine hepatotoxische wirkung. Der Wirkungsmechanismus ist jedoch im Gegensatz zum Aflatoxin B_1 noch unbekannt (GEDEK, 1970).

Die LD_{50} wird für weibliche Ratten von BAMBURG et al. (1968) je nach Applikationsform entweder mit 0,75 mg/kg bei intraperitonealer oder mit 7,3 mg/kg Körpergewicht bei oraler Verabreichung angegeben.

Auf der enthaarten Rückenhaut von 21 Tage alten Ratten führte die Verreibung von 5 mg Diacetoxyscirpenol, gelöst in Äthylenacetat, zu verschiedenartigen Veränderungen. Sie äußerten sich im Auftreten von gerade noch wahrnehmbaren Hautreaktionen mit leichter Schorfbildung, gefolgt von einer Entzündung erst drei bis fünf Tage später oder in der Manifestation von Haemorrhagie und starker Schorfbildung innerhalb der gleichen Zeit. Auch bei anderen Tierarten erwies sich Diacetoxyscirpenol als dermotoxisch (UENO, 1970).

STÄHELIN et al. (1968) führen weitere LD_{50}-Werte des Diacetoxyscirpenol für die Ratte und andere Laboratoriumstiere an und weisen dabei auch gleichzeitig auf die Menge des Toxins hin, welche von den verschiedenen Tierarten toleriert werden (s.Tab. 3).

Tabelle 3: Akute Toxizität des Diacetoxyscirpenol bei einmaliger Verabreichung nach STÄHELIN (1968)

Tierart	LD_{50} mg/kg i.v.	Dosis maxima tolerata mg/kg, i.v.
Maus	12	6,0
Ratte	1,3	0,55
Kaninchen	1,0	0,30
Hund	ca 1,1	0,60

Bei allen Tierarten trat der Tod frühestens 10 - 49 Stunden nach der Injektion ein. Kaninchen starben zum Teil erst vier Tage nach der Applikation. In den ersten Stunden nach der Injektion zeigten die Tiere Apathie, verlangsamte Atmung, Cyanose, Diarrhoe, blutigen Stuhl, Erbrechen, Tremor und Tachycardie, später waren die Symptome uncharakteristisch.

Das Diacetoxyscirpenol hat sich auch für Regenbogenforellen als toxisch erwiesen. Jedoch ist es für diese Tierart erst in einer höheren Konzentration als das Aflatoxin B_1 tödlich (MARASAS et al., 1967).

STÄHELIN et al. (1968) berichten über eine cytostatische Aktivität von Diacetoxyscirpenol, die bei in vitro Versuchen festgestellt wurde. In niedrigen Toxinkonzentrationen wurde die Vermehrung des Vaccina-Virus gehemmt.

Auf phytotoxische Eigenschaften des Giftes wurde von BRIAN (1961) hingewiesen. Eine gerade noch wahrzunehmende Hemmung der Stengelverlängerung und eine bemerkenswerte Versengung des Laubes wurde durch eine Menge von 1 µg/ml Diacetoxyscirpenol bei Erbsen hervorgerufen. 10 µg/ml reduzierten

die Stengelverlängerung lebensbedrohend, versengten die Blätter noch intensiver und brachten viele Pflanzen zum Absterben. Ähnliche Schäden rief das Toxin auch bei Kopfsalat und Winter-Wicken hervor.

Einzellern gegenüber entfaltet es dagegen nur geringe Cytotoxizität (STÄHELIN et al., 1968).

Als minimale Hemmkonzentrationen (ausgedrückt in µg/ml) wurden bei verschiedenen Bakterienarten und Hefen folgende Werte festgestellt.

M. pyogenes, var. aureus	10,
B. subtilis	10,
E. coli	32,
Candida albicans	ca. 500,
Sacch. cerevisiae	ca. 1000.

5. Rubratoxine

a) Vorkommen

BRUNSIDE et al. (1957) berichteten als erste über die Toxizität von Penicillium rubrum. Sie isolierten diese Schimmelpilzart aus Futtermitteln, in denen noch zwölf andere Species nachzuweisen waren.

Eine Gewinnung toxischer Substanzen gelang TOWNSEND et al. (1966) aus Kulturen des Penicillium rubrum Stammes, M. R. 043 nach elf bis dreizehn-tägiger Anreicherung in 2 % Malzextrakt enthaltenden RAULIN-THOM- Medium. Bei der Aufarbeitung des ein blaßgelbes Pulver darstellendes toxischen Rohmaterials ließ sich vom Rubratoxin A ein weiterer Stoff, das Rubratoxin B abtrennen.

Das Rubratoxin B gilt nach Untersuchungen von MOSS et al. (1967) als das wesentlichere Produkt des Penicillium rubrum Stoffwechsels und weist von beiden Komponenten die höhere Toxizität auf. Allerdings ist das Bildungsvermögen unter den Penicillium rubrum STOLL-Stämmen keine weitverbreitete Eigenschaft.

b) Physikalisch-chemische Daten und dünnschichtchromatographischer Nachweis

Das reine Rubratoxin B - $C_{26}H_{30}O_{11}$ - stellt ein weißes amorphes Pulver dar, welches folgende Eigenschaften besitzt: Schmelzpunkt 168 - 170 °C (Zerfall), $[\alpha]_D^{20}$ + 67, spez. Rotation; C : 58,9 %, H : 5,8 %, Molekulargewicht 518. Die Strukturformel wurde von MOSS et al. (1968, 1969) aufgeklärt. In seiner chemischen Struktur zeigt es Ähnlichkeit mit der Byssochlaminsäure.

Der physikalisch-chemische Nachweis gelingt nach Reinigung über eine Silikalgel-Säule dünnschichtchromatographisch mit Kieselgel als Sorptionsmittel und mit Äther-Dioxan im Verhältnis 3 : 1 als Fließmittel (FRANK, 1970).

Im ultravioletten Absorptionsspektrum liegt das Maximum bei 250 mμ (MOSS, 1968 b), was MOSS (1968 a) auf die beiden zweifachsubstituierten Malein-Anhydrid-Gruppen zurückführt.

c) Wirkungen in vivo

Von BURNSIDE et al. (1957) wird eine Krankheit bei Rindern und Schweinen beschrieben, die nach der Verfütterung von mit Penicillium rubrum kontaminiertem Futter auftrat. Die pathologisch-anatomischen Untersuchungen verendeter Tiere

ergaben schwere Leber- und Nierenschäden, besonders charakterisiert durch das Auftreten von Blutungen und fettigen Degenerationen. Ähnliche Veränderungen beobachteten FORGACS et al. (1958) auch bei Hühnern.

Nach BAILEY und GROTH (1959) stehen das Krankheitsbild der bei Hunden vorkommenden "Hepatitis X" und der bei Schweinen auftretenden "Moldy Corn Toxicosis" aetiologisch in einem ursächlichen Zusammenhang.

WILSON und WILSON (1962 a, 1962 b), die sich besonders um die Gewinnung größerer Toxinmengen und deren Reindarstellung bemühten, gelang nach Verabreichung des Rubratoxin B in verschiedenen Dosen an Mäusen, Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden bei diesen Tierarten hepatotoxische und haemorrhagische Syndrome zu erzeugen. Innerhalb von ein bis zwei Stunden nach der Toxinapplikation waren bei Mäusen bereits akute Reaktionen festzustellen.

Das mikroskopische Bild der belasteten Leber deutete auf das Vorliegen von Blutstauungen und Haemorrhagien wie auf das Vorhandensein schwacher bis mittelmäßiger fettiger Zelldegenerationen hin.

Als LD_{50} wurde für weiße Mäuse bei intravenöser Applikation eine Toxinmenge von 0,2 - 0,4 mg; bei intraperitonealer Verabreichung von 0,1 - 0,2 mg ermittelt.

Zum Wirkungsmechanismus des Rubratoxin B in der Leber führten HAYES und WILSON (1970) Untersuchungen an der Maus durch. Bei tierexperimentellen Untersuchungen verwendeten sie kristallines Rubratoxin B, das sie nach der von ihnen 1968 beschriebenen Methode gewonnen hatten. Eine einmalige intraperitoneal verabreichte Dosis von 0,67 mg/kg Körpergewicht Rubratoxin B, gelöst in Propylenglykol, rief eine temporäre Unterbindung des Leucineinbaus in die Leberproteine bei 20 - 30 g schweren, männlichen Swiss-Webster-Mäusen hervor,

der zwölf Stunden später eine zwei Tage anhaltende Stimulation der Leberproteinsynthese folgte. Nach einer Verabreichung von Rubratoxin B in höherer Dosierung an die gleiche Tierart in Mengen von 1,67 mg/kg und 2,67 mg/kg Körpergewicht war eine Herabsetzung des Gesamtglykogen- und Proteinspiegels zu verzeichnen.

Viermal aufeinanderfolgende, tägliche Injektionen von insgesamt 0,67 mg/kg Körpergewicht Rubratoxin B intraperitoneal lösten bei der gleichen Tierart Wachstumssuppression aus und führten auch zu einer verminderten Futteraufnahme bei den toxinbelasteten Tieren. Die Zusammensetzung der Leber dabei war nicht nennenswert verändert.

Unterschiede im Wirkungsmechanismus in der Abhängigkeit von der Art der Applikation intraperitoneal oder oral waren bei den Versuchstieren nicht ablesbar. Jedoch wurde ungefähr 80 mal mehr Rubratoxin B benötigt, um nach oraler Verabreichung die gleichen Veränderungen wie bei intraperitonealer Verabfolgung hervorzurufen.

EDWARDS und WOGAN (1968) bestimmten die LD_{50} bei Ratten. Sie ermittelten für diese Tierspecies Werte von 0,35 mg/kg und 350 mg/kg Körpergewicht, je nachdem, ob das Toxin intraperitoneal oder oral appliziert wurde. Ratten, denen 60 Wochen lang dreimal pro Woche oral 5 oder 10 mg/kg Körpergewicht Toxin verabreicht wurde, entwickelten chronische Leberschäden. Neoplastische Veränderungen lagen bis zur 87. Woche nicht vor.

Eine synergistische Wirkung von Rubratoxin B und Aflatoxin B_1 beschrieben EDWARDS und WOGAN (1968). Bei gleichzeitiger Verfütterung von beiden Toxinen an Ratten traten bei den Versuchstieren Leberschäden auf, die in der Art der Schwere der Erkrankung jedes Toxin für sich allein in der gewählten Dosierung nicht imstande war, hervorzurufen.

Eine toxische Wirkung des Rubratoxin B wurde auch gegenüber Mikroorganismen festgestellt. Eine Hemmwirkung war in Gegenwart von 30 µg einer Rubratoxin B enthaltenden Säurefraktion bei Bacillus subtilis, Bacillus cereus und Staphylococcus aureus bei Versuchen von WILSON und WILSON (1962 b) festzustellen.

Chlorella pyrenoidosa reagierte mit einer Ausbildung einer Hemmzone auf Agarplatten gegenüber Bakterien, Pilzen und Algen. Rubratoxin B übte bei diesen Testen dagegen in einer Konzentration von 100 - 1,000 µg weder auf Algen noch auf Pilze oder gramnegative Bakterien eine wachstumshemmende Wirkung aus. Wie aus der Tabelle 4 zu ersehen ist, scheint das Rubratoxin B nur eine relativ geringe Toxizität gegenüber Bakterien zu entfalten.

Anders verhält es sich damit jedoch bei den bereits auf einer höheren Entwicklungsstufe stehenden Flagellaten Tetrahymena pyriformis und Volvox aureus (s.Tab. 4).

Tabelle 4: Rubratoxin B empfindliche Mikroorganismen nach HAYES und WYATT (1970)

Mikroorganismen	Zahl d. gehemmten Arten	Minimale Hemmkonzentration in µg/ml
Bacillus spp.	4	1,000
Micrococcus spp.	2	1,000
Staphylococcus spp.	1	1,000
Tetrahymena pyriformis	1	25
Volvox aureus	1	50

6. Byssochlaminsäure

a) Vorkommen

Paecilomyces varioti BAIN., die anascosporogene Form von Byssochlamys fulva OLLIV. et SMITH (BROWN, 1957) stellt einen häufigen Verderber von Fruchtsäften und Obstkonserven dar (PUT, 1964; SENSER und REHM, 1965; REHM , 1967; SENSER et al., 1967 a). Der wirtschaftliche Schaden, der durch diesen Pilz verursacht wird ist beträchtlich. Er besiedelt aber auch fetthaltige Produkte (COURSEY, 1961). DAMM (1951) wies darauf hin, daß unsere heimischen Fruchtsäfte durch diesen Pilz infiziert sind.

SCHANDERL (1955) isolierte Paecilomyces varioti aus Apfelsaft in Süddeutschland.

b) Physikalisch-chemische Daten und dünnschichtchromatographischer Nachweis

Der Pilz bildet, wenn die Glucose im Substrat weitgehend erschöpft ist, neben großen Mengen Mannit, als wesentlichstes Stoffwechselprodukt die Byssochlaminsäure, deren Konstitution bekannt ist (RAISTRICK, 1933).

Der strukturelle Aufbau der Byssochlaminsäure wurde durch dreidimensionale Röntgenanalyse bestimmt (HAMOR, 1962). Byssochlaminsäure, $C_{18}H_{20}O_6$, Schmelzpunkt bei 163,5 °C, enthält ein neungliedriges, doppelt ungesättigtes Ringsystem, sowie zwei fünfgliedrige Säureanhydridgruppierungen und zeigt die Tendenz Indanderivate zu bilden (BALDWIN, 1962).

Ähnlich wie bei den Aflatoxinen steht bei der Byssochlaminsäure das Ausmaß einer Toxinbildung in keiner direkten Beziehung zum Umfang der Pilzentwicklung (MEYER und REHM, 1967). Das hängt damit zusammen, daß die Byssochlaminsäure eben erst während des sekundären Stoffwechsels des Pilzes nach weitgehender Assimilation der vorhandenen Kohlenstoffquellen entsteht. Ihre Bildung wird verlangsamt bei gleichzeitigem Mangel an Nitrat (MEYER und REHM, 1967); sie erfordert weiternin die Gegenwart von Sauerstoff. Dagegen spielt der pH-Wert bei der Synthese eine geringere Rolle. Die Bildung erfolgt in einem relativ weiten Bereich von pH 2,5 und 8,0.

Die Sporen von Paecilomyces varioti sind überaus hitzeresistent und werden auf diese Weise deshalb trotz mancher Mikroorganismen feindlicher Vorgänge bei der Fruchtsaftherstellung nicht vernichtet. (FORGACS, 1962; SENSER et al., 1967 b). Da sie nur ein relativ geringes Sauerstoffbedürfnis haben, gegenüber Kohlendioxyd nicht nennenswert empfind-

lich sind, können sie sich sowohl in den Tanks als auch noch nach der Abfüllung in Flaschen im Fruchtsaft gut entwickeln (SENSER et al., 1967 b).

Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Byssochlaminsäure wurden von SCHMIDT und REHM (1969) entwickelt. Mit Säureindikatoren, wie z.B. Bromkresolgrün oder Bromphenolblau gibt die Byssochlaminsäure deutliche Reaktionen. Damit ist es möglich Mengen bis zu 10 - 20 µg nachzuweisen.

Als Anhydrid zeigt die Byssochlaminsäure außerdem eine positive Hydroxanat-Reaktion. Das Besprühen der Byssochlaminsäure verdächtiger Flecke kann bei der Papier- oder Dünnschichtchromatographie nach einer von STAHL (1967) angegebenen Methode erfolgen. Das sich in Gegenwart von Byssochlaminsäure bildende Hydroxanat gibt mit Eisen-(III) Ionen eine braune Färbung. Dieser Nachweis ist empfindlicher als das vorhergehende Verfahren. Die Grenze für die Nachweisbarkeit liegt hier zwischen 50 und 100 µg. Eine weitere Nachweismöglichkeit ist gegeben durch die Absorption von UV-Licht durch die Byssochlaminsäure. Sie erscheint dabei unter der UV-Lampe (254 mµ) auf Papier oder auf der DC-Platte bei Beschichtung mit Cellulose oder Kieselgel G als dunkler Fleck. Besonders geeignet sind Dünnschichtplatten mit Kieselgel HF_{254} als Sorptionsmittel. Auf dieser wird die Fluoreszenz des beigemischten Indikators in Gegenwart von Byssochlaminsäure gelöscht und der dunkle Fleck der Säure hebt sich gegen die hellfluoreszierende Platte ab. Eine Menge von 5 µg ist noch gut ohne zusätzliche optische Hilfsmittel zu erkennen. Da hiermit die höchste Empfindlichkeit einer Anzeige erreicht wird, bedient man sich heute vor allem dieser Technik, wenn eine quantitative Bestimmung der Byssochlaminsäure in Lösungen mit unbekanntem Gehalt erfolgen soll. Hierfür wurden Eichungen mit einer Verdünnungsreihe von 10 - 100 µg Byssochlaminsäure pro ml

Äthanol bzw. Chloroform für die Absorption der Byssochlaminsäure bei 244 mμ (hier liegt das Maximum der UV-Absorption der Byssochlaminsäure) mit dem BECKMANN-Photometer vorgenommen. Der Bereich von 10 - 50 μg erwies sich als geeignet, da man hier ein lineares Verhältnis von Konzentration zur Extinktion hat.

Da die Byssochlaminsäure in Nährlösungen oder Fruchsäften stets neben anderen Substanzen vorkommt, muß sie zunächst von diesen Begleitstoffen abgetrennt werden, um sie quantitativ bestimmen zu können. Dies gelingt bei CZAPEK-DOX-Nährlösungen (mit der C-Quelle Glucose oder Glycerin) und bei Fruchtsäften mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.

c) Wirkungen in vivo

Eine toxische Wirkung der Byssochlaminsäure wurde bereits 1933 an Mäusen festgestellt (RAISTRICK, 1933).

MEYER und REHM (1969) prüften, ob Byssochlaminsäure eine keimschädigende oder wachstumshemmende Wirkung bei keimenden Samen auszuüben vermag. Sie brachten dazu Samen von Sinapis alba L. (weißer Senf) in Schalen zum Keimen und beträufelten sie mit wässrigen Lösungen von Na-Byssochlamat nach RAISTRICK (1933). Die Versuche wurden in Gegenwart von Licht und auch in der Dunkelheit durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß Na-Byssochlamat in niedrigen Konzentrationen hemmend auf das Streckenwachstum von Hypocotyl und Radicula wirkt und in höheren Konzentrationen sogar die Keimung unterdrücken kann. Keimlinge, an die niedrige Konzentrationen Na-Byssochlamat verabreicht wurden (0,001 - 0,005 %), zeigten fleckig, hellviolette Unterseiten der Keimblättchen und fast blasse, nahezu unbehaarte Hypocotyle im Gegensatz zu den einheitlich dunkelviolett gefärbten Keimblättchen

und deutlich violetten, kräftig behaarten Hypocotylen der unbehandelten Kontrollen.

Weiterhin wurde festgestellt, daß Na-Byssochlamat sowie Kulturfiltrate des Pilzes die Gärung von Saccharomyces cerevisiae hemmen können. Der direkte Nachweis einer speziellen Hemmung der Alkohol-Dehydrogenase durch die Byssochlaminsäure bestätigt diese Beobachtung bei der Gärprobe mit Saccharomyces cerevisiae (SCHMIDT und REHM, 1970). In Konzentrationen von 10^{-2}_{m} und 10^{-3}_{m} konnte unter dem Einfluß der Byssochlaminsäure eine vollständige bzw. schwache Hemmung der Adenosin-Desaminase festgestellt werden. In einer Konzentration von 10^{-2}_{m} übt die Byssochlaminsäure eine Hemmwirkung auf die Enzyme Alkohol-Dehydrogenase und Isocitrat-Dehydrogenase aus.

Von Hühnern wird berichtet, daß mit Paecilomyces varioti befallenes Getreide bei diesen das sogenannte "haemorrhagische Geflügelsyndrom" hervorzurufen vermochte.

C. Biologische Verfahren zum Nachweis von Mykotoxinen

Für den Nachweis von Mykotoxinen stehen außer physikalisch-chemischen Methoden auch biologische Verfahren zur Verfügung. Jedoch sind diese Verfahren, von einigen Ausnahmen abgesehen, bislang eigentlich nur für die Aflatoxine und hier auch wiederum oftmals nur für das Aflatoxin B_1 ausgearbeitet worden. Das Verhalten gegenüber den dazu ausgewählten biologischen Testobjekten ist von den anderen Schimmelpilzgiften dagegen vielfach noch gänzlich unbekannt. Das trifft auch für den Hühnerembryotest zu, welcher im Rahmen dieser Arbeit auf seine Eignung für den Nachweis von verschiedenen Mykotoxinen verderbniserregender Schimmelpilze überprüft werden sollte.

1. Mit Vielzellern oder deren Körperzellen

a) Hühnerembryonen

Hühnerembryonen haben sich als biologische Testobjekte allgemein schon vielfach bewährt. Giftige Substanzen ließen sich auf diese Weise von ungiftigen trennen. Aber auch der Nachweis teratogener Eigenschaften konnte bei manchen Stoffen damit geführt werden. Bereits 1893 konnte FÉRÉ die teratogene Wirkung von Chemikalien auf dem Weg über das bebrütete Hühnerei nachweisen. Seither findet das Brutei immer wieder erneut Verwendung, vor allem wenn es gilt, die Toxizität von Stoffen näher zu bestimmen, die sich heutzutage in der Umgebung von Mensch und Tier besonders anreichern.

Die Toxizität und die teratogene Wirkung von Metallen wie Blei prüften beispielsweise KARNOFSKY (1952), RIDGWAY und KARNOFSKY (1952) und CLEGG (1964) mit Hilfe des Hühnerembryotests. Befruchtete Hühnereier erhielten hierbei am vierten oder achten Tag der Embryonalentwicklung die zu prüfenden Verbindungen injiziert. Toxikologische Untersuchungen mit verschiedenen Chemikalien und Pestiziden wurden von anderen Autoren am Brutei durchgeführt (Mc LAUGHLIN und MUTCHLER, 1962; MARLIAC und MUTCHLER, 1963; MC LAUGHLIN et al. 1963; Mc LAUGHLIN et al., 1964; WALKER, 1967; KHERA, 1968; SMITH et al., 1970). Teratogene Effekte mancher Pharmaka und Antibiotika oder die biologische Verträglichkeit von Ölen und Lipoiden konnten mit Hilfe dieses Testobjektes nachgewiesen werden (KARNOFSKY, 1950; FRANCISCIS und LANDAUER, 1959; GOERTTLER, 1962; KEMPER, 1962; VERRETT und Mc LAUGHLIN, 1963; VERRETT und MUTCHLER, 1964; GRIEM, 1967).

Für mykotoxikologische Untersuchungen wurde es zuerst von PLATT et al. (1962) herangezogen. Sie injizierten "Erdnußtoxin" in den Dottersack fünf Tage alter Hühnerembryonen,

wobei innerhalb von vier Stunden mit weniger als 0,3 µg der Tod eintrat. SPENSLEY (1963) wies auf die besondere Empfindlichkeit des Hühnerembryos gegenüber Aflatoxin hin.

VERRETT et al. (1964) bestätigten die hohe Empfänglichkeit des Hühnerembryos für diese Mykotoxine. Bei der von ihnen angewandten Technik injizierten sie crude-Aflatoxin oder gereinigtes Aflatoxin B_1 und G_1 vor der Bebrütung der Hühnereier und zwar entweder in den Dottersack oder in die Luftkammer. Als Lösungsmittel verwendeten sie Propylenglykol, welches sich in einer Menge von 0,04 - 0,05 ml pro Ei für den Embryo als unschädlich erwiesen hatte. Die Embryonalentwicklung wurde bis zum Schlupftermin verfolgt. Während dieser Zeit abgestorbene Embryonen wurden auf pathologisch-anatomische Veränderungen untersucht; bei den Überlebenden wurde besonders auf Mißbildungen geachtet. Bei diesen Experimenten stellten VERRETT et al. (1964) eine höhere Toxizität des Aflatoxin B_1 bei der Injektion in die Luftkammer als bei der Applikation in den Dottersack fest. Bei Dottersackverimpfung wurde als LD_{50} eine Aflatoxin B_1-Menge von 0,048 µg ermittelt; bei Beschickung der Luftkammer betrug sie dagegen nur 0,025 µg. Aflatoxin G_1 erwies sich nach Injektion in den Dottersack als weniger toxisch für den Hühnerembryo als Aflatoxin B_1. Bei der Applikation von 1,0 µg Aflatoxin G_1 pro Ei betrug die Sterblichkeitsrate 60 %; bei 2,0 µg Aflatoxin G_1 pro Ei 90 %. Die makroskopische Untersuchung während der Toxinbelastung abgestorbener Embryonen ergab unabhängig davon, ob das Aflatoxin B_1 über den Dottersack oder via Luftkammer appliziert worden war als Anzeichen der Toxinwirkung allgemeine Wachstumsverzögerung, Ödeme, Haemorrhagien, Unterentwicklung des Mesencephalon bei Embryonen, die vor dem siebten Tag starben, gefleckte und granulierte Leberoberfläche sowie Gliedmaßenverkürzung. Im Rahmen dieser Versuche konnte nachgewiesen werden, daß die Empfänglichkeit des Embryos

für die Aflatoxine mit zunehmendem Alter anscheinend zurückgeht, denn der höchste Grad an Toxizität wurde erreicht bei der Applikation des Aflatoxin B_1 vor der Bebrütung.

Andere Toxinbelastungsversuche von GABLIKS et al. (1965) führten zu dem Ergebnis, daß Entenembryonen noch vier- bis fünfmal empfindlicher gegenüber Aflatoxin B_1 reagieren als Hühnerembryonen. Allerdings wurde bei diesen Versuchen das Toxin erst appliziert als die erste Hälfte der Embryonalentwicklung bereits abgeschlossen war. Sie injizierten das Toxin in die Choreoallantoishöhle von zehn Tage alten Hühnerembryonen und 15 Tage alten Entenembryonen . Zur Erreichung der LD_{50} reichten bei Entenembryonen Aflatoxin B_1-Mengen von 0,25 - 0,5 µg pro Ei aus, entsprechend 1,0 - 2,5 µg bei Hühnerembryonen. Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Empfänglichkeit von Entenküken im Vergleich zu Hühnerküken einerseits und der abnehmenden Empfindlichkeit von Zellkulturen je nachdem ob sie embryonalen Ursprungs sind oder von erwachsenen Individuen stammen (NEWBERNE et al., 1964; ASPLIN und CARNAGHAN, 1961; SULLMANN et al., 1970).

Weitere Untersuchungen von CHOUDHARY und MANJREKAR (1967) bestätigten im wesentlichen die mitgeteilten Befunde. Sie fanden, daß Hühnerembryonen sich sehr verschieden hohen Aflatoxinmengen gegenüber als empfindlich erweisen. Die Empfänglichkeit des Embryos für Aflatoxin B_1 nimmt aber mit zunehmendem Alter rapide ab, bei der Applikation des Toxins vor der Bebrütung wird der stärkste Effekt erreicht. Als histopathologische Veränderungen stellten sie Blutstauungen, fettige Leberzelldegeneration, Lebernekrose und Gallengangsproliferationen fest. Diese traten vor allem bei neun Tage alten Embryonen besonders hervor.

Andere Toxizitätsprüfungen führten JAYARAMAN et al. (1968) mit Aflatoxin B_1, Aflatoxin G_1 und einer Mischung aus beiden Toxinen an neun Tage alten Hühnerembryonen durch. Dabei wiesen Embryonen, die in Eierkartons inkubiert worden waren, eine größere Empfindlichkeit gegenüber Aflatoxinen auf als Eier, die auf Watte liegend oder in einem herkömmlichen Bebrütungsapparat gehalten worden waren. Die LD_{100} lag bei Karton-inkubierten Embryonen bei 0,01 µg Aflatoxin B_1 bzw. 1,0 µg Aflatoxin G_1 pro Ei; im Brutapparat betrug sie 5,0 µg für Aflatoxin B_1 und 2,0 µg pro Ei für Aflatoxin G_1.

SHIBKO et al. (1968) injizierten Aflatoxin B_1 wie VERRETT et al. (1964) in die Luftkammer von Bruteiern. Sie verwendeten dazu fünf verschiedene Konzentrationen des Toxins (3,0 µg/ml; 1,19 µg/ml; 0,476 µg/ml; 0,189 µg/ml; 0,075 µg/ml) und beimpften auch Eier mit dem Lösungsmittel (Propylenglykol) allein. Erst bei der Verabreichung einer etwa der LD_{70} entsprechenden Dosis, ließ sich nach dem zwölften Tag der Embryonalentwicklung eine Depression des Wachstums feststellen. Die überlebenden Embryonen wiesen dabei keine makroskopisch sichtbaren Veränderungen auf. Die Überprüfung verschiedener Enzymaktivitäten ergab bei den mit Aflatoxin B_1 belasteten Eiern nur geringe Abweichungen von den Kontrollen. Toxische Dosen des Aflatoxin B_1 beeinträchtigen somit nicht die frühen Stadien der Differenzierung und des Wachstums.

Von den anderen starken Schimmelpilzgiften liegen über die Toxizität gegenüber Hühnerembryonen bislang noch keine Ergebnisse vor. Lediglich für das gelegentlich in Aspergillus flavus-Kulturen auftretende Aspertoxin, über dessen praktische Bedeutung noch wenig bekannt ist, liegt ein Untersuchungsbefund vor. Dieses Produkt des Aspergillus flavus-Stoffwechsels hat sich wie die Aflatoxine B_1 und G_1

ebenfalls als relativ toxisch gegenüber Hühnerembryonen erwiesen. Als LD_{50}-Wert wird 0,7 µg pro Ei angegeben (RODRICKS et al., 1968).

b) Entenküken

Als besonders geeignetes Testobjekt für den Nachweis der Aflatoxine ist in der Literatur das Eintagsentenküken beschrieben. Der hierfür entwickelte Test ist nicht darauf ausgerichtet, die Mortalität bei den besonders empfindlich gegenüber Aflatoxinen reagierenden Entenküken zu bestimmen, sondern konzentriert sich allein auf das Auftreten und das jeweilige Ausmaß von charakteristischen Gallengangsproliferationen (SARGEANT et al., 1961 a und b; CARNAGHAN et al., 1963; ARMBRECHT und FITZHUGH, 1964; WOGAN, 1965). Bei der Durchführung des Tests wird an die Eintagsentenküken vermutlich aflatoxinhaltiges Material, in Wasser oder Propylenglykol gelöst, entweder in einer Kapsel oder mit Hilfe von Magensonden vier bis fünf Tage lang verabreicht. Am achten Tag nach Versuchsbeginn werden die überlebenden Tiere getötet und jeweils der Grad der Gallengangsproliferationen histologisch mit Null oder mit 1+ bis 4+ bzw. 5+ beurteilt.

Bei den Eintagsentenküken sind allerdings auch die LD_{50}-Werte bestimmt worden, so daß diese auch für Toxizitätsbestimmungen der Aflatoxine herangezogen werden können. Jedoch werden hier Werte von den Aflatoxinen erst meßbar, die weitaus höher liegen als diejenigen, die bei den Küken Gallengangsproliferationen hervorrufen. CARNAGHAN et al. (1963) erhielten bei oraler Belastung von Eintagsentenküken für die Aflatoxine B_1 und G_1 sowie deren Hydroderivate folgende LD_{50}-Werte, ausgedrückt in µg pro 50 g Körper-

gewicht: B_1 = 18,2; B_2 = 84,2; G_1 = 39,2; G_2 = 172,5. Bei der Ermittlung dieser LD_{50}-Werte waren die verschiedenen Aflatoxine in 0,1 ml Dimethylformamid jeweils an acht Tiere appliziert worden und die Mortalität nach der Letalität innerhalb von sieben Tagen beurteilt worden. Aus diesen unterschiedlichen LD_{50}-Werten wird allgemein der Schluß gezogen, daß die beiden Dihydrofurane B_2 und G_2 gegenüber den Verbindungen mit einer Doppelbindung eine um den Faktor 4,5 verringerte Toxizität verfügen und daß die Monolaktone B_1 und B_2 außerdem doppelt so giftig wie die Dilaktone G_1 und G_2 sind. Da die Feststellung der LD_{50} nach CARNAGHAN et al., (1963) eine größere Tierzahl und auch eine größere Menge an Futter erfordert, ist dieser Test dem anderen Verfahren unterlegen.

Von SPENSLEY (1963) wird noch eine andere Form eines Tests mit Enten vorgeschlagen. Er nimmt eine Bestimmung nach Toxizitätsgraden vor. Sterben Enten nach der Aufnahme von 80 g einer vermutlich aflatoxinhaltigen Probe innerhalb von sieben Tagen nach Versuchsbeginn an charakteristischen Leberschädigungen, ist das Versuchsmaterial als stark toxisch zu bezeichnen. Überleben sie bis zum siebten Tag des Versuchs, weisen aber bei der Autopsie Leberläsionen auf, so ist das Untersuchungsmaterial als mäßig oder leicht toxisch anzusprechen. Auf diese Weise konnte Aflatoxin B_1 noch in Konzentrationen von 1 : 10 000 000 festgestellt werden.

THEODOSSIADES (1963) empfiehlt ebenfalls Entenküken als Testobjekte für die Ermittlung der Toxizität von Aspergillus flavus-haltigen Erdnußölkuchen. Mengen, die für Enten noch akut toxisch waren, erwiesen sich bei Schweinen als subakut toxisch.

CIEGLER und LILLEHOJ (1968) wiesen jedoch darauf hin, daß die nach Aflatoxinapplikation bei Versuchstieren auftre-

tende Hyperplasie nicht spezifisch ist. Ähnliche Veränderungen im Testorganismus sind nach ihren Erfahrungen ebenso von anderen toxischen Substanzen bekannt. Der Ententest sollte deshalb immer in Verbindung mit dünnschichtchromatographischen Nachweisverfahren durchgeführt werden.

c) Laboratoriumstiere

Da die Wirkung von Mykotoxinen bei Tieren maßgeblich vom Alter, Geschlecht, Rasse und Ernährungszustand beeinflußt wird, werden Laboratoriumstiere für den biologischen Nachweis wenig herangezogen. Zur Erreichung der LD_{50} sind auch relativ hohe Mengen erforderlich. Es wurde jedoch beobachtet, daß Ätherextrakte toxinhaltiger Pilzsubstrate auf die rasierte Kaninchenhaut aufgetragen, Hyperämie, Ödeme, seröse Exsudation und Nekrose hervorrufen können. Es wird deshalb verschiedentlich empfohlen schimmeliges Untersuchungsmaterial für den Dermaltest mit Laboratoriumstieren bei Raumtemperatur zu trocknen, dann fein zu mahlen und anschließend 30 g drei Stunden lang mit wasserfreiem Äther in einem Soxhlet-Apparat zu extrahieren. Zu dem Ätherextrakt gibt man 10 ml Olivenöl und verdampft den Äther anschließend an der Luft. Jeweils 125 ml des öligen Rückstandes sind dann an drei aufeinanderfolgenden Tagen auf einer rasierten Stelle (12,5 cm^2) des Rücken mehrerer Kaninchen ohne vorherige Skarifizierung aufzutragen und die verschiedenen behandelten Stellen dann täglich auf eine entzündliche Reaktion zu überprüfen (FORGACS und CARLL, 1962). Da jedoch die Dermotoxizität mit Ausnahme vom Diacetoxyscirpenol (UNEO, 1970) bei den anderen starken Schimmelpilzgiften nicht stark genug ausgeprägt ist, hat der Dermaltest als biologisches Nachweisverfahren keine allzu große Bedeutung erlangt.

d) Larven und Eier des Zebrafischs

ABEDI und Mc KINLEY (1968) beobachteten, daß Aflatoxin B_1 auch gegenüber Embryonen und Larven des Zebrafischs Brachydanio rerio HAMILTON-BUCHANAN eine toxische Wirkung entfaltet. Sie erwiesen sich empfindlicher als manche anderen für den Aflatoxinnachweis empfohlenen Testobjekte. Der Zebrafisch ist ein eierlegender Aquariumzierfisch. Da er sich das ganze Jahr über im Labor züchten läßt, erhält man jederzeit eine große Anzahl von Eiern, aus denen sich in drei bis vier Tagen Larven entwickeln. ABEDI und Mc KINLEY, (1968) verwendeten bei ihren Versuchen von Brachydanio rerio Eier im einzelligen Blastoderm-Stadium, im ersten Zellteilungsstadium (zwei bis sechs Zellen), im Blastula- und Gastrulastadium und ein bis zwei Tage alte Larven. Eier eines jeden Entwicklungsstadiums wurden Aflatoxin B_1-Konzentrationen bis zu 1 µg/ml ausgesetzt. Diese übten keine sofortige Wirkung auf die verschiedenen Entwicklungsstadien aus, so daß die Entwicklung der Embryonen zuerst normal war. Abnormitäten, die danach beobachtet wurden, bestanden in einem leicht verdrehten Schwanzende und einer Dilatation der Dotterkugel. Dann folgte eine Paralyse des Schwanzes und Verdrehung entlang der Axiallinie. Bevor der Tod eintrat, erfolgte Lysis vom lädierten Schwanzende der Embryonen aus. Bei Verabreichung von 1 µg/ml Aflatoxin B_1 starben alle Embryonen innerhalb von 72 Stunden. Bei darunter liegenden Konzentrationen verlängerte sich dieser Zeitraum um einige Stunden bis zu mehreren Tagen. Die geschädigten Embryonen zeigten zunächst noch wachstum; vor Eintritt des Todes pigmentierten sie sich. Durch die Unfähigkeit infolge der Paralyse des Schwanzes das Chorion durch schlagende Schwanzbewegungen einzureißen, waren sie am Schlüpfen gehindert. Nach Verabreichung von Konzentrationen bis 1 µg/ml an Larven traten bei diesen bereits innerhalb weniger Minuten anormale Bewegungen auf; 30 Minuten später flauten

diese Bewegungen ab und nach fünf bis sechs Stunden waren die Larven moribund. Die Farbe der Dotterkugel verdunkelte sich und nach 20-stündiger Toxineinwirkung wies der Larvenschwanz einen Knoten auf. Die darauffolgende Lysis begann im Gegensatz zu den Embryonen bei den Larven von der Dotterkugel aus, die entweder einriß oder noch vor dem Tode verlagert wurde. Das zufriedenstellende Testergebnis veranlaßte ABEDI und SCOTT (1969) auch andere Mykotoxine in ihrer Wirkung auf diesen Organismus zu prüfen und ihn wegen seiner leichten Handhabung und vieler anderer Vorteile für den Mykotoxinnachweis zu empfehlen. Mit diesem Testobjekt lassen sich von den Aflatoxinen B_1, B_2, G_1 und G_2, Ochratoxin A, Sterigmatocystin und Diacetoxyscirpenol kleinere Mengen nachweisen, als beispielsweise mit Versuchstieren wie Eintagsentenküken oder Ratten (s.Tab. 5).

Tabelle 5: Unterschiedliche akute Toxizität von Schimmelpilzgiften gegenüber verschiedenen Testorganismen nach ABEDI und SCOTT (1969)

Toxin	Zebrafischlarven LC_{50}, µg/ml	Entchen LD_{50} µg/Tier a	Ratte LD_{50}, mg/kg KGW b
Aflatoxin B_1	0,58; 0,44	18,2	6,0
Aflatoxin B_2	1,0 ; 1,0	84,8	-
Aflatoxin G_1	0,83; 0,75	39,2	-
Aflatoxin G_2	4,2	172,5	-
Ochratoxin A	1,7	150	-
Sterigmatocystin	0,24	-	60
Diacetoxyscirpenol	4,8	-	0,75

a = oral; b = intraperitoneal

e) Insekten

GUDAUSKAS et al. (1967) untersuchten die Wirkung der Aflatoxine auf Raupen der Kleinschmetterlingsart Heliothis virescens. Gereinigtes Aflatoxin B_1 oder eine Mischung, bestehend aus B_1, B_2, G_1 und G_2 wurden hierzu verwendet. Die Heliothis virescens-Larven erhielten verschiedene Toxinkonzentrationen, gelöst in deionisiertem Wasser, über eine Fertignahrung. 30 bis 90 Tiere wurden hierzu je Versuchsanordnung, in verschiedenen Schachteln getrennt voneinander, mit Aflatoxin kontaminiertem Futter ernährt. Es zeigte sich bei diesen Versuchen abermals, daß entsprechend den Erfahrungen mit anderen biologischen Testobjekten die Empfindlichkeit auch bei dieser Tierart gegenüber den Toxinen mit zunehmendem Alter abnimmt. Die geprüften Konzentrationen lagen zwischen 0,0001 und 1 µg. Die unter 1 µg liegenden Konzentrationen besaßen eine Wirkung nur gegenüber frischschlüpfenden Larven. Nach der Aufnahme von einer Gesamtmenge von 10 µg Aflatoxin B_1 verendeten nach 22 Tagen 50 % der geschlüpften Raupem.

Von MATSUMARA und KNIGHT (1967) wurden zur Toxizitätsprüfung als weitere Insektenarten Gelbfiebermosquito, Aedes aegypti L., Stubenfliege Musca domestica und Obstfliege Drosophilia melanogaster MEIGEN herangezogen. Aflatoxin B_1 gegenüber wurden die Species im Larven- oder Erwachsenenstadium exponiert.

Das Ergebnis des Einflußes auf die Eiproduktion und die Schlupffähigkeit geht aus Tabelle 6 hervor. Aus ihr ist zu entnehmen, daß die Prozentzahl aus den Eiern geschlüpfter Individuen bei allen getesteten Insekten unter der Toxineinwirkung im Vergleich zur Kontrolle reduziert war.

Tabelle 6: Wirkung von Aflatoxin B_1 auf die Eierproduktion und die Schlupffähigkeit bei verschiedenen Insektenarten nach MATSUMARA und KNIGHT (1967)

Insektenart: Entwicklungsstadium	Aflatoxinkonzentration	Mortalität in %	Anzahl d. produzierten Eier	Prozentzahl d. geschlüpften Individuen
A.aegypti:				
Larven	3 ppm	2; 2^x	179; 227^x	54,5; $69,4^x$
Erwachsen	0,0006 %	26; 28^x	34; 222^x	0 ; $27,3^x$
M.domestic:				
Erwachsen	0,3 %	71; 3^x	84; 1650^x	4,7; $56,5^x$
D.melanogaster:				
Erwachsen	0,05 %	90; 17^x	82; 420^x	0 ; $79,4^x$

Die mit x bezeichneten Zahlen geben die Kontrollgruppe an.

Die Empfänglichkeit von Insekten für Mykotoxine wird auch durch andere Untersuchungen bestätigt. Nach BEARD und WALTON (1965) sowie AMONKAR und NAIR (1966) erwies sich ein nicht näher definiertes Aspergillustoxin ebenfalls für Larven der Stubenfliege als tödlich.

SHAH et al. (1968) zogen zur Prüfung der Toxizität von Pilzen aus Bodenproben die Gelbfiebermosquito, Aedes aegypti L. heran. Die Beeinflussung des Wachstums bei der Reismotte Corcyra cephalonica ST. nach Verabreichung von mit A. flavus, A. oryzae, P. purpurogenum und P. rubrum kontaminiertem Erdnußschrot und Weizenkleie studierten HEDGE et al. (1967). Sie verwendeten hierzu Larven im Alter von zehn Tagen und bestimmten bei diesen in Abständen bis zum Zeit-

punkt der Verpuppung das Gewicht. Dabei erwies sich Weizenkleie gegenüber Erdnußschrot als toxischer. Hierfür werden als Faktoren ungleiche Toxinzusammensetzung und verschieden hoher Toxingehalt sowie unterschiedliches Nährstoffangebot und Inbalanz im Angebot der Nährstoffe verantwortlich gemacht. Derartige Feststellungen weisen darauf hin, welche Mängel allgemein Fütterungsversuchen anhaften können. Solche Experimente lassen sich zu Testzwecken nicht so gut standardisieren wie Verfahren, bei denen mit von der Nahrung abgetrennten Stoffwechselprodukten von toxinbildenden Pilzen gearbeitet wird. Bei Belastungsversuchen mit verpilztem Futter muß in Betracht gezogen werden, daß Proteinmangel und Unterernährung, worauf MORCOS et al. (1963) und MADHAVAN et al. (1965) bereits hingewiesen haben , einen Toxineffekt verstärken können. Im vorliegenden Fall wurde die höhere Toxizität kontaminierter Weizenkleie mit einem gleichzeitig vorhandenen geringen Proteingehalt erklärt.

Als weitere Anregung für die Verwendung von Insekten als Testobjekte für toxische Effekte von Schimmelpilzen, sei die Untersuchung der Wirkung der Aflatoxine auf die Enzyme des Zitronensäurezyklus der Reismottenlarven durch HEDGE und SHANMUGASUNDARAM (1967), erwähnt.

Die Enzymaktivitäten wurden hierbei über den Atmungsstoffwechsel unter Verwendung eines Larvenhomogenats mit Hilfe der Warburg-Apparatur gemessen. 15 Tage alte Larven bekamen acht Tage lang als Futter Weizenkleie und Erdnußschrot mit und ohne Kontamination von Aspergillus flavus. Außerdem wurden Larven auch mit einer 1 mg ungereinigtes Toxin pro Gramm enthaltender Weizenkleie ernährt. Es zeigte sich, daß folgende Enzyme des Zitronensäurezyklus bei kontaminiertem Erdnußschrot gegenüber unkontaminiertem signifikant gehemmt waren, nämlich Zitronensäuredehydrogenase, α-Ketoglutarsäuredehydrogenase, Fumarase und Maleinsäuredehydrogenase. Bei kontaminierter Weizenkleie waren im Vergleich zur un-

kontaminierten Kontrolle noch zusätzlich die Enzyme Sukzinatdehydrogenase und Isozitronensäuredehydrogenase gehemmt. Nach der Aufnahme von mit ungereinigtem Aflatoxin versetzter Weizenkleie setzte eine starke Hemmung der Enzymaktivitäten erst nach einer Anlaufzeit von 90 - 120 Minuten ein. Bei allen Belastungsversuchen zeigte sich abermals der stärkere Effekt nach Verzehr von Weizenkleie im Vergleich zum Erdnußschrot. Als Ursache wurde auch hier wieder angenommen der geringere N-Gehalt von Weizenkleie bzw. die Abweichung in der Toxinzusammensetzung bei Erdnußschrot und Weizenkleie, z.B. durch einen Gehalt der Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2 im Erdnußschrot bei Vorhandensein von nur Aflatoxin B_1 und G_1 in der Weizenkleie, weil letztere toxischer wirken als Aflatoxin B_2 und G_2.

f) Kleinkrebse

Die Meereskrabbe Artemia salina, die als Testobjekt für die Prüfung von Anästhetika (ROBINSON, 1965) und Insektiziden (MICHAEL, 1956; GROSCH, 1967) bereits Verwendung fand, wurde von BROWN et al. (1968) für mykotoxikologische Experimente herangezogen. Sie untersuchten an dieser Tierspecies die temperaturabhängige Wirkung des Aflatoxin B_1. Im Test wurden die Temperaturen 21 °C, 27 °C, 32 °C, 35 °C, 37 °C, 37,5 °C, 40 °C und 43 °C geprüft. Mit steigender Temperatur erhöhte sich die Empfindlichkeit der Kleinkrebse gegenüber dem Toxin. Bei 37,5 °C war bereits die höchste Empfindlichkeitsstufe erreicht. Toxineffekte ließen sich schon nach Verabreichung von 0,5 µg Aflatoxin B_1 pro ml künstliches Meerwasser feststellen; die Mortalität betrug bei dieser Konzentration 60 %. Wurden Aflatoxinmengen von $\geq$ 1,0 g/ml Meerwasser verabreicht, lag die Mortalität bei 90 %. Das Ergebnis war innerhalb von 24 Stunden ablesbar. Toxizitätsprüfungen wurden am gleichen Testobjekt mit

Erfolg auch mit teilweise gereinigtem Ochratoxin A sowie mit einem Acetonextrakt aus einer Fusarium trichothecum Kultur durchgeführt (BROWN, 1969).

g) Mollusken

Die im Süßwasser lebende Schnecke Planorbarius corneus L. (Posthornschnecke) wurde in diesem Milieu der Wirkung von Aflatoxin B_1 in verschieden hohen Konzentrationen ausgesetzt. Nach einer Einwirkungsdauer von 48 Stunden betrug die LD_{50} 0,2 ppm, wobei sich der Toxineffekt äußerlich durch ein Anschwellen der zarten Fühler bemerkbar machte. Bei elektronenoptischer Untersuchung waren in den Epithelzellen der Fühler, aber auch in den darunterliegenden Kernen der Muskel- und Bindegewebszellen, bereits nach zwei-stündiger Einwirkung einer 10 ppm Aflatoxin B_1 beschickten Lösung nukleolare Veränderungen nachweisbar. Sie waren erkennbar in einer Ausbildung von Protuberanzen (Kappen), die nach BAUER und MÜLLER (1970) als Umorganisierung bzw. Zonierung der nukleolaren Substanzen zu deuten sind.

Besonders empfindlich gegenüber Aflatoxin B_1 reagieren nach TOWNSLEY und LEE (1967) auch befruchtete Eier der marinen Bohrmuschel Bankia setacea. In Konzentrationen, die die Kernteilung und die Beweglichkeit der Spermien unbeeinflußt lassen, unterbleibt bei diesen bereits die Zellwandbildung. Aflatoxin B_1-Mengen von < 40 µg/ml Medium sollen auf diese Weise feststellbar sein.

Danach stehen für mykotoxikologische Untersuchungen sehr verschiedene Arten von Vielzellern mit teilweise recht differenzierter Empfindlichkeit zur Verfügung.

Weitere zytotoxische Effekte ließen sich in Gegenwart von Schimmelpilzgiften bei der Verwendung von Zellkulturen

tierischer oder menschlicher Gewebe als Testobjekte feststellen.

h) Zellkulturen von menschlichen und tierischen Gewebe

Die beim Aflatoxin B_1 nachgewiesene mitosehemmende Wirkung wird von LEGATOR und WITHROW (1964) für ein Nachweisverfahren ausgenutzt. Sie stellten fest, daß rohe Aflatoxinmischungen wie kristallisiertes Aflatoxin B_1 die Mitose in heteroploiden und diploiden menschlichen Embryolungenzellen innerhalb von vier bis sechs Stunden nach der Zugabe hemmen. Auf diese Weise kann auch noch eine Aflatoxinkonzentration von 0,01 µg hiermit ermittelt werden. In Gegenwart einer 0,05 µg Aflatoxin B_1-Menge beträgt die Mitosehemmung im Vergleich zur Kontrolle etwa 50 %.

Erste Untersuchungen mit Aflatoxin führten JUHASZ und GRECZI (1964) an Kälbernierenkulturen durch. Sie beobachteten dabei eine Zerstörung des Zytoplasmas und des Nucleus. Toxinkonzentrationen von 0,1 - 0,5 ppm erwiesen sich innerhalb von 48 Stunden in dieser Weise als zytotoxisch. Bei der Testung des Aflatoxins in seiner Wirkung gegenüber menschlichen Embryolungenzellen stellten LEGATOR et al. (1965) neben einer Verringerung des Zellzuwachses in Gegenwart von 0,05 - 1,0 ppm Aflatoxin B_1 eine ins Abnorme gesteigerte Riesenzellbildung fest. Eine Hemmung der normalen Zellteilung als Aflatoxineffekt wies auch DANIEL (1965) bei Rattenfibroblasten nach.

GABLIKS et al. (1965 a), die zu Toxizitätsbestimmungen verschiedene Zellsysteme heranzogen, beobachteten eine Verringerung des Zellzuwachses, gefolgt von zunehmender Granulation und Abrundung. Die vergleichenden Untersuchungen ergaben, daß menschliche Leberzellen, Entenembryozellen und Hela-Zellen gleichermaßen empfindlich gegenüber Afla-

toxin B_1 reagieren. Dagegen erwiesen sich Zellen von Hühnerembryonen als wesentlich widerstandsfähiger gegenüber diesem Schimmelpilztoxin. Dies entspricht der bereits mitgeteilten Beobachtung von ASPLIN und CARNAGHAN (1961), die bei Belastungsversuchen mit Enten- und Hühnerküken eine geringere Empfindlichkeit bei letzteren festgestellt haben.

SULLMAN et al. (1970) wiesen an menschlichen Embryozellen die unterschiedliche Toxizität der Aflatoxine gegenüber Gewebe von Säugern nach. Die höchste Toxizität entfaltete gegenüber dem gewählten Zellsystem das Aflatoxin B_1, eine geringere Toxizität wie im Ententest zeigte das Aflatoxin G_1. Von den Dihydroderivaten erwies sich jedoch das Aflatoxin G_2 im Vergleich zum Aflatoxin B_2 als toxischer. Die unter der Toxineinwirkung feststellbaren Veränderungen an den Zellen bestanden in einer Zunahme der Helligkeit und einer Verdickung der Kernmembran. Der Nucleolus war nur schlecht zu erkennen, ebenso das grün fluoreszierende Chromatin. Bei Verwendung von nicht embryonalen menschlichen Leberzellen wurde von den Autoren LD_{50}-Werte des Aflatoxin B_1 16,7 µg/ml bei 24-stündiger und 14,3 µg/ml bei 48-stündiger Einwirkungszeit des Giftes bestimmt. Damit wurde gleichzeitig eine geringere Toxizität des Aflatoxin B_1 gegenüber menschlichen Leberzellen Erwachsener als gegenüber Embryoleberzellen festgestellt und somit abermals die größere Sensibilität von Warmblütlern in Abhängigkeit vom Lebensalter bestätigt.

Mit der geringeren Ansprechbarkeit von Zellkulturen Erwachsener ist die Verwendungsfähigkeit dieses Testobjektes für den Mykotoxinnachweis eingeschränkt. Deshalb scheiden jedoch Zellkulturen für den Nachweis von Schimmelpilztoxinen als Testobjekte nicht grundsätzlich aus, denn von anderen Mykotoxinen wie Sterigmatocystin und Diacetoxyscirpenol werden zelltoxische Effekte bei relativ geringer Dosierung

gegenüber Gewebekulturen mitgeteilt (ENGELBRECHT, 1970; STAHELIN et al., 1968), die die Anwendung eines Zellkulturtestes als Routineverfahren lohnenswert erscheinen lassen. Da jedoch nicht alle hier abgehandelten hepatotoxischen Schimmelpilzgifte Mitosegifte sind (NESHEIM, 1967), dürfte dabei die Bestimmung der zellzerstörenden Wirkung im Vordergrund stehen.

2. Einzeller

Die gleichzeitig bei Vielzellern und Einzellern vorhandene Empfänglichkeit für das besonders giftige Schimmelpilzgift Aflatoxin B_1 hat dazu geführt, daß auch Mikroorganismen als Testobjekte für den Nachweis dieses Toxins und anderer Mykotoxine heute empfohlen werden.

a) Bakterien

Hierzu dienen in erster Linie Bakterien, die vor allem zur Bestimmung des Aflatoxin B_1-Gehaltes Verwendung finden, wenn ein bereits auf anderem Wege gewonnenes Testergebnis noch weiter abgesichert werden soll (GOLDBLATT, 1969).

BURNEISTER und HESSELTINE (1966) prüften für diesen Zweck insgesamt 329 Mikroorganismenarten, Bakterien, Pilze, Algen und Protozoen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Aflatoxin B_1. Dabei wiesen ein Stamm von Bacillus brevis und zwei Stämme von B. megaterium die größte Empfindlichkeit gegenüber diesem Toxin auf. Die MHK lag bei diesen Stämmen bei 10 und 15 µg Aflatoxin B_1 pro ml Nährmedium.

CIEGLER et al. (1966) testeten weitere 1000 Stämme von Mikroorganismen und fanden dabei einen Flavobacterium-Stamm, welcher sich gegenüber wenigen Mikrogramm Aflatoxin B_1 als

sensibel zeigte.

ARAI (1967) berichtet über Hemmeffekte im Bereich von 7,5 µg Aflatoxin B_1 pro ml Medium gegenüber Streptomyces- und Nocardiaarten.

Die Empfindlichkeit von Bacillus megaterium bereits gegenüber 1 µg Aflatoxin B_1 wird von CLEMENTS (1968) für ein Nachweisverfahren ausgenutzt. Dem Verfahren liegt die Technik der mikrobiologischen Antibiotikabestimmungsmethoden im Agardiffusionstest zu Grunde (GROVE, 1955). Hiermit ist die Anwesenheit dieser kleinen Aflatoxin B_1-Menge bereits nach 15 - 18 Stunden, erkennbar an einer genau definierbaren Hemmzone, feststellbar. Unter dem Einfluß des Toxins treten abweichende Zellformen auf, die als verlängerte Zellen in gefärbten Präparaten in der Randzone der Wachstumshemmung nachgewiesen werden können. Die Schnelligkeit des Verfahrens und die Einfachheit der Technik imponiert bei diesem Test. Gegenüber anderen Verfahren, wie z.B. Ententest, ist die Empfindlichkeit auch gleichzeitig höher. Im Vergleich zum Hühnerembryotest ist die Anzeige bei diesem Verfahren jedoch geringer.

Weitere zelltoxische Einflüsse wurden bei Studien der Morphologie gegenüber Aflatoxin B_1 exponierter Bakterienzellen festgestellt (WRAGG et al., 1967; LILLEHOJ, 1967). Untersuchungen über die Schädigung des Bakterienstoffwechsels unter dem Einfluß von Aflatoxin B_1 wurden ebenso durchgeführt (SMITH, 1965; NEZVAL et al., 1970). Die Ergebnisse dieser Experimente sind aber für die Entwicklung von Testverfahren bisher nicht herangezogen worden.

Da bei anderen Mykotoxinen die Toxizität gegenüber Bakterien noch weniger stark ausgeprägt ist oder sogar gänzlich fehlt im Bereich von Toxinmengen von < 1000 µg/ml Nährsubstrat, ist ein auf antibakterieller Wirkung beruhender Test zur

Bestimmung von Aflatoxinen in Lebens- und Futtermitteln zu wenig vielseitig verwendbar. Nach Untersuchungen von JAYARAMAN et al. (1968) ist allerdings möglich mit Hilfe des Agardiffusionstests unter Verwendung von Testblättchen und mit Hilfe von Bacillus megaterium-Sporen nicht nur Aflatoxin B_1-Mengen von 1 - 4 µg/disc, sondern auch Aflatoxin G_1 in einer Konzentration von 4 - 8 µg/disc nachzuweisen.

b) Algen

Die Grünalge Chlorella pyrenoidosa erwies sich gegenüber einer Reihe von Kumarinabkömmlingen als empfindlich. IKAWA et al. (1969) verwenden diesen Testorganismus für den Nachweis von Aflatoxin B_1. Bei diesem Test wird in einem flüssigen Medium das Wachstum von Chlorella pyrenoidosa turbidimetrisch gemessen und danach die Toxinkonzentration anhand der halben Wachstumsgröße bestimmt. Bereits 4 µg/ml Aflatoxin B_1 wird bei diesem Verfahren von der Alge angezeigt.

c) Pilze

Durch einige Pilze, besonders Dactylium dendroides, Absidia repens und Mucor griseo-cyanus wird Aflatoxin B_1 zu 50 bis 60 % in eine blaufluoreszierende Substanz umgewandelt, die einen geringeren Rf-Wert (0,57) als Aflatoxin B_1 (0,69) aufweist (DETROY, 1968; HESSELTINE, 1969). Die spezifische Umwandlung durch bestimmte Pilzarten ist diagnostisch verwertbar.

d) Protozoen

Bei Protozoen beobachten TEUNISSON und ROBERTSON (1967) ein ähnliches Verhalten. In Gegenwart von Tetrahymena pyriformis W. verringert sich der Gehalt an Aflatoxin B_1 innerhalb von 48 Stunden um 67 % und es wird eine hellblaufluoreszierende Substanz mit einem geringeren Rf-Wert (0,52) neben Aflatoxin B_1 (0,59) dünnschichtchromatographisch nachweisbar.

Einen Test zum Nachweis von Aflatoxin B_1 mit Amöben des Limax-Typ entwickelten BAUER und Mitarbeiter (BAUER et al., 1968; BAUER und LEISTNER, 1969). Hierzu wurden die Amöben vom Limax-Typ Aflatoxin B_1-Konzentrationen von 0,2 - 50,0 µg/ml ausgesetzt. Die in Gegenwart des Toxins gebildeten Zysten degenerierten kurz nach ihrer Entstehung, gefolgt von einer Lysis der Zellen. Eine zellschädigende Wirkung gegenüber vegetativen Amöben konnte dagegen bei gleicher Dosierung nicht festgestellt werden. Lediglich die Vermehrungsrate der Kulturen war in Gegenwart von Aflatoxin B_1 leicht herabgesetzt, wenn die Toxinkonzentration < 2 µg/ml war. Die spezifische letale Wirkung von Aflatoxin B_1 gegenüber Amöben in einer bestimmten Entwicklungsphase sowie der relativ geringe technische und zeitliche Aufwand veranlaßten die Autoren dieses Testobjekt für den biologischen Nachweis von Aflatoxin B_1 zu empfehlen.

III. [illegible] Untersuchungen mit Hilfe des Hühnerembryotests

A. Versuche mit gereinigten Mykotoxinen

1. Material und Methodik

Es wurden befruchtete Hühnereier der Rasse Weißes Leghorn der Linien M x K und A x K für diese Versuche verwendet und der Durchführung des Tests die Methode nach VERRETT et al. (1964, zusammengefaßt, da bei den bisherigen Prüfungen der Aflatoxine im Eitest das Verfahren dieser Autoren die höchste Empfindlichkeit gezeigt hatte (s.S. 40). Allerdings erwies es sich als erforderlich, die Methode geringfügig zu modifizieren. Die Notwendigkeit einer gewissen Abwandlung des Tests ergab sich vor allem aus der unterschiedlichen Löslichkeit der zu prüfenden Mykotoxine in organischen Lösungsmitteln und deren möglicher Toxizität für das Hühnerei. Diese Frage stellte sich, als von den verschiedenen Toxinen teilweise höhere Mengen verimpft werden mußten als in der für das Hühnerei als unschädlich ermittelten Konzentration von 0,04 ml/Ei Propylenglykol in Lösung ging. Besondere Schwierigkeiten bereitete in dieser Hinsicht die Byssochlaminsäure, da sie sich besonders schlecht in Propylenglykol löst und danach in ein Verdünnungsmittel wie Aqua dest., physiologische Kochsalzlösung oder [illegible] Salzlösung überführen läßt. Außerdem erschien es zur Vereinheitlichung des Tests im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der einzelnen Testergebnisse der verschiedenen Toxine untereinander und auch in bezug auf die spätere Anwendung des Tests als Routineverfahren als zweckmäßig, nicht mehrere Lösungsmittel zu verwenden. In Vorversuchen wurde geklärt, daß anstelle von Propylenglykol, welches bereits in Konzentrationen

von > 0,08 ml für das Hühnerei toxisch ist, Dimethylformamid als Lösungsmittel am besten geeignet ist. In diesem organischen Lösungsmittel waren mit Ausnahme der Byssochlaminsäure 1 - 10 mg von den zu prüfenden Toxinen jeweils in 0,1 ml löslich und ließen sich ohne auszufallen in Aqua dest. überführen. Auf diese Weise betrug die in Höchstfalle mit dem Toxin in das Ei injizierte Dimethylformamidmenge 0,1 - 0,2 µl. In dieser Konzentration bestand in ihrer Wirkung auf den Hühnerembryo kein Unterschied zu reinem Wasser. Lediglich für die Lösung der Byssochlaminsäure mußte die doppelte Menge Dimethylformamid verwendet werden. Durch sie wurde aber das Testergebnis nicht negativ beeinflußt (s.S. 65). Aqua dest. diente allgemein als Verdünnungsmittel. Damit wurde nach der Herstellung einer Stammlösung von den Aflatoxinen, Ochratoxin A, Sterigmatocystin, Diacetoxyscirpenol und Rubratoxin B auch die weitere Verdünnung der Toxine vorgenommen.

Jedes dieser Toxine, welche als Reinsubstanz entweder von Makor Chemicals Ltd, Jerusalem oder von Roth, Karlsruhe bezogen worden waren und die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Rehm, Münster überlassene Byssochlaminsäure wurden in mehreren abgestuften Konzentrationen entsprechend einer geometrischen Reihe geprüft. Maßgeblich für die erste Festlegung der verschiedenen zu testenden Toxinkonzentrationen waren die Erfahrungen anderer tierexperimenteller Untersuchungen (CIEGLER und LILLEHOJ, 1968; GEDEK und HOFMANN, 1970 a und b). Bei der Wiederholung der Testreihen bestimmten dann die Ergebnisse der ersten Reihe die zu prüfenden Konzentrationen. Auf diese Weise wurde von den verschiedenen Toxinen im Minimum sechs, im Maximum vierzehn verschiedene Konzentrationen geprüft (s.S. 63). Von den zwei von VERRETT et al. (1964) angegebenen Möglichkeiten, die Toxine gegenüber dem Hühnerembryo zu exponieren, wurde die Luftkammer gewählt. Hierzu wurden die befruchteten Eier vor der Bebrütung durchleuchtet und mit einem Bleistift auf der Kalkschale die Luft-

kammer angezeichnet. Danach wurde die markierte Zone mit Jodtinktur bepinselt und in deren Zentrum in die Kalkschale mit einer abgeflammten Präpariernadel ein Loch gebohrt. Durch dieses Loch erfolgte dann mit einer Einwegspritze und einer 0,90 x 38 mm Kanüle die Injektion der Toxinlösung. Die Impfmenge pro Ei betrug jeweils 0,1 ml. Im Anschluß daran wurde das Loch mit Tesaband verschlossen und die Eier noch eine Stunde mit dem stumpfen Pol nach oben bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um eine möglichst gleichmäßige Diffusion des Inokulums durch die innere Schalenhaut zu gewährleisten. Erst nach dieser Zeit wurden die beimpften Eier in horizontaler Lage in den Flächenbebrüter gebracht. Unter zweimaligen täglichen Wenden wurden sie bei einer Temperatur von 37,4 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65 % darin 20 Tage lang bis kurz vor dem Schlupf gehalten. Ab vierten Tag der Bebrütung wurden die Eier täglich durchleuchtet und diejenigen aussortiert, welche entweder abgestorben waren oder bei denen keine Embryonalentwicklung eingesetzt hatte. Abgestorbene Embryonen konnten dabei durch das Unsichtbarwerden der Blutgefäße der Area vasculosa bzw. Allantois erkannt werden. Blutungen in der Area vasculosa und Stase im Randsinus wurden als Zeichen einer Schädigung gewertet. Abgestorbene Embryonen ließen sich im Vergleich zu den noch lebenden passiv durch leichtes Schütteln im Ei hin und her bewegen. Sie wurden seziert und auf Veränderungen untersucht. Das gleiche erfolgte bei allen überlebenden Embryonen, bei denen das Schlüpfen nicht abgewartet wurde und die nach 20-tägigen Aufenthalt im Inkubator getötet wurden, um den Versuch nicht unnötig zu verlängern und das Verfahren zu vereinfachen.

Mit jeder zu prüfenden Toxinkonzentration wurden wenigstens 20 Eier beimpft. Dabei wurde berücksichtigt, daß der Ermittlung toxikologischer Daten in der Regel Werte, bezogen auf ein Kilogramm Körpergewicht, zugrunde gelegt werden.

Bei einem Gewicht von 50 g pro Ei entspricht die Zahl 20 gerade einem Kilogramm. Die wiederholte Testung der abgestuften Toxinmengen zielte darauf ab, folgende Werte von jedem geprüften Schimmelpilzgift zu erhalten:

erstens die LD_{100}, entsprechend der Dosis letalis maxima, bei welcher die Embryonalentwicklung im beimpften Hühnerei völlig unterbleibt oder sämtliche Embryonen während der Bebrütungszeit von 20 Tagen sterben;

zweitens die LD_{50}, jene Dosis letalis, bei welcher eine Absterberate nur bei 50 % der Embryonen unter der Toxinbelastung nachweisbar ist und

drittens die LD_5, für die als Dosis letalis minima eine auf das Toxin zurückzuführende Absterberate von 5 % der Eier einer Versuchsreihe zutrifft.

Ausfälle, die sich aus der Verfahrenstechnik der Beimpfung vor der Bebrütung ergaben, wurden dabei nicht gewertet.

Durch die gleichzeitige Testung des Lösungs- und Verdünnungsmittels jeweils als Kontrolle zu den einzelnen Testreihen wurde auch versucht, von den einzelnen Schimmelpilzgiften die für den Hühnerembryo unschädlichen Mengen zu ermitteln. Die Werte die hierfür zu erhalten waren, wurden als Dosis tolerata = DT_{100} bei den Ergebnissen angegeben.

2. Ergebnisse

Unter Einhaltung der beschriebenen Technik wurden bei der Prüfung der verschiedenen Mykotoxine im Hühnerembryotest folgende Ergebnisse erzielt, die unter Angabe der getesteten Konzentrationen im einzelnen wiedergegeben werden.

1. Aflatoxin B_1

a) geprüfte Konzentrationen in µg pro Ei:
0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,012; 0,006,

b) Testergebnis in µg pro Ei:

LD_{100}	LD_{50}	LD_5	DT_{100}
> 0,1	0,05	< 0,006	< 0,006

2. Aflatoxin B_2

a) geprüfte Konzentrationen in µg pro Ei:
50; 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05,

b) Testergebnis in µg pro Ei:

LD_{100}	LD_{50}	LD_5	DT_{100}
> 1	0,5	0,05	< 0,05

3. Aflatoxin G_1

a) geprüfte Konzentrationen in µg pro Ei:
5; 4; 3; 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025;

b) Testergebnis in µg pro Ei:

LD_{100}	LD_{50}	LD_5	DT_{100}
> 2	1	0,5	0,2

4. Aflatoxin G_2

a) geprüfte Konzentrationen in µg pro Ei:
100; 50; 25; 10; 5; 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05,

b) Testergebnis in µg pro Ei:

LD_{100}	LD_{50}	LD_5	DT_{100}
> 25	5	1	< 1

5. Ochratoxin A

a) geprüfte Konzentrationen in µg pro Ei:
100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 2; 1;

b) Testergebnis in µg pro Ei:

LD_{100}	LD_{50}	LD_5	DT_{100}
> 50	10	2	< 1

6. Sterigmatocystin

a) geprüfte Konzentrationen in µg pro Ei:
2; 1; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,0025; 0,0012; 0,006,

b) Testergebnis in µg pro Ei:

LD_{100}	LD_{50}	LD_5	DT_{100}
> 2	1	0,006	< 0,006

7. Diacetoxyscirpenol

a) geprüfte Konzentrationen in µg pro Ei:
> 1; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025;

b) Testergebnis in µg pro Ei:

LD_{100}	LD_{50}	LD_5	DT_{100}
> 1	0,5	0,025	< 0,025

8. Rubratoxin B

a) geprüfte Konzentrationen in µg pro Ei:
500; 250; 100; 50; 25; 10; 5; 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05;

b) Testergebnis in µg pro Ei:

LD_{100}	LD_{50}	LD_5	DT_{100}
$> 500^{+}$	$> 500^{+}$	$> 500^{+}$	$< 500^{+}$

+) wegen der Unschädlichkeit in Konzentrationen von 500 µg pro Ei wurde auf eine genaue Bestimmung verzichtet.

9. Byssochlaminsäure

a) geprüfte Konzentrationen in µg pro Ei:
1000; 800; 600; 400; 100; 40; 10; 1; 0,5; 0,2; 0,1;

b) Testergebnis in µg pro Ei:

LD_{100}	LD_{50}	LD_5	DT_{100}
$> 1000^{+}$	$> 1000^{+}$	$500\text{-}1000^{+}$	< 500

+) wegen geringer Ansprechbarkeit des Testobjektes wurde auf eine genaue Bestimmung verzichtet.

Bei den sieben von neun Mykotoxinen, bei welchen sich die geprüften Konzentrationen als derart toxisch erwiesen haben, daß eine Bestimmung der LD_{100}- und LD_{50}-Werte möglich war, zeigten die Embryonen keine für ein bestimmtes Toxin typischen Schädigungen. Bei der Sektion waren unabhängig von der Art des applizierten Toxins in einer für den Hühnerembryo toxischen Menge als pathologisch-anatomische Veränderungen Zwergwuchs, Kopfödeme, Mißbildungen an Kopf und Beinen sowie Verfärbung der Leber und Haemorrhagien nachweisbar, die verschiedentlich, aber nur vereinzelt, auch bei den nur mit Lösungs- und Verdünnungsmittel beimpften Kontrollen zu beobachten waren. Charakteristisch für eine auf die Schimmelpilzgiftwirkung zurückzuführende akute Toxizität war bei den Aflatoxinen, Ochratoxin A, Sterigmatocystin und Diacetoxyscirpenol das Absterben von 3/3 der Eier mit Embryonalentwicklung bis zum zehnten Versuchstag bei Erreichen der Dosis letalis maxima.

Bei Vorliegen von LD_{50}-Mengen starb die Hälfte der Embryonen dagegen nicht schon während der ersten zehn Tage der Eibebrütung ab, sondern jeweils etwa der dritte Teil davon überlebte zunächst diesen Bebrütungszeitraum. Stellten sich auch in der Kontrollreihe, also ohne Toxinbelastung, gelegentlich Verluste ein, so traten diese völlig regellos während der 20-tägigen Versuchsdauer auf. Sie ergaben sich zwangsläufig aus der Technik des Tests, bei welchem der Beimpfung vor der Bebrütung der Vorzug gegeben wurde und wobei auf eine Lösung der Mykotoxine in einem organischen Lösungsmittel nicht verzichtet werden konnte. Aus diesem Grunde sprechen VERRETT et al. (1964) Ausfälle bis 20 % bei Anwendung dieser Technik des Hühnerembryotests auch noch als normal an. Da aber das Befruchtungsergebnis und die Embryonalentwicklung beim Huhn sehr großen jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt, fand dieser Faktor bei der

Auswertung der Teste im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit im Gegensatz zu VERRETT et al. (1964) jeweils entsprechend Berücksichtigung. Demgemäß weicht die hier mitgeteilte LD_{50} des Aflatoxin B_1 von dem von VERRETT et al. (1964) angegebenen Wert ab, denn diese Autoren ließen diesen Faktor seinerzeit bei ihrer Kalkulation außer acht. Bei den Testen jedoch, über die hier berichtet wird, ergaben sich bei Wiederholungen Übereinstimmungen hinsichtlich der LD_{50} — LD_5 und DT_{100} nur dann, wenn dieser Faktor mit in die Auswertung einbezogen wurde.

3. Besprechung der Ergebnisse

Bei diesen Testen bestätigte sich die bereits von VERRETT et al. (1964) nachgewiesene hohe Toxizität des Aflatoxin B_1 für das Hühnerei. Keines der anderen geprüften Mykotoxine entwickelte diesem Testobjekt gegenüber eine vergleichbare Toxizität. Das geht eindeutig aus einer Gegenüberstellung der LD_{50}-Werte der verschiedenen Mykotoxine, die bislang noch nicht im Hühnerembryotest geprüft worden waren, im Vergleich zur LD_{50} des Aflatoxin B_1 hervor (s.Tab. 7).

Tabelle 7: Im Hühnerembryotest nachgewiesene akute Toxizität von Schimmelpilzgiften

Toxin	Angabe der LD_{50}-Werte in µg/Ei	Koeffizient der Toxizität +
Aflatoxin B_1	0,05	1
Aflatoxin B_2	0,5	10
Aflatoxin G_1	1,0	20
Aflatoxin G_2	5,0	100
Ochratoxin A	10,0	200
Sterigmatocystin	1,0	20
Diacetoxyscirpenol	0,5	10

+) Berechnet: die LD_{50} für Aflatoxin B_1

Bei der Beurteilung der Giftigkeit der einzelnen Mykotoxine für den Hühnerembryo unter Bezugnahme auf die Toxizität des Aflatoxin B_1 ergaben sich bei diesem Test für die Aflatoxine B_2, G_1 und G_2 von anderen Testobjekten abweichende Toxizitätsverhältnisse. Aus der Tabelle 7 ist eine höhere Toxizität des Aflatoxin B_2 für den Hühnerembryo ablesbar als für Aflatoxin G_1 und G_2. Im Ententest und bei der Prüfung der Hepatotoxizität dieser vier Aflatoxine im Belastungsversuch mit Meerschweinchen hatte sich das Aflatoxin G_1 als die stärker toxische Verbindung gezeigt. Während allerdings die vier Aflatoxine B_1, B_2, G_1 und G_2 im Verhältnis 1:4,7:2,2:9,5 für Eintagsentenküken toxisch waren, erwiesen sie sich beim Meerschweinchen in einer Relation von 1:16:4:128 als akut lebertoxisch (GEDEK und HOFMANN, 1970 a). Das wechselhafte Verhalten der Aflatoxine in der Toxizität gegenüber diesen verschiedenen, ausgewählten Testobjekten verdeutlicht, daß es entgegen der früheren Annahme (GOLDBLATT, 1969) nicht möglich ist, eine Giftwirkung bei landwirtschaftlichen Nutztieren sowie auch beim Menschen in gleicher Relation wie beim Versuchstier zu erwarten. Gleiches trifft auch für die anderen Mykotoxine zu.

Diacetoxyscirpenol erwies sich gegenüber Meerschweinchen und anderen Säugern als ungleich toxischer als gegenüber Hühnerembryonen (STÄHELIN et al., 1968; GEDEK und HOFMANN, 1970 a).

Mit dem Rubratoxin B und der Byssochlaminsäure konnten in Konzentrationen, die bei Meerschweinchen Leberveränderungen hervorrufen und in der Kultur Zellen tierischer Gewebe zerstören (GEDEK und HOFMANN, 1970 a; GEDEK, 1971), keine toxischen Effekte im Test mit Hühnerembryonen festgestellt werden, so daß dieses Verfahren für den Nachweis dieser Mykotoxine grundsätzlich nicht geeignet ist. Da von den Hühnerembryonen noch 500 µg pro Ei Rubratoxin B oder Byssochlaminsäure toleriert wurden, bedeutet dies, daß im Hühnerembryo-

test Toxinmengen von<100 ppm dieser beiden Schimmelpilzgifte nicht angezeigt werden. Eine fünf- bis zehnfach geringere Rubratoxin B-Menge verursacht aber nach einmaliger oraler Applikation bei Meerschweinchen bereits Leberveränderungen, abgesehen davon, daß das Rubratoxin B in Vergesellschaftung mit Aflatoxin B_1 in noch kleineren Dosen bei Tieren hepatotoxisch wirken kann (EDWARDS und WOGAN, 1968).

Eine im Vergleich zu anderen Testobjekten geringere Empfindlichkeit ergab die Prüfung der verschiedenen Mykotoxine im Hühnerembryotest auch beim Ochratoxin A, obwohl diesem Mykotoxin eine dem Aflatoxin B_1 entsprechende Hepatotoxizität zugeschrieben wird (VAN DER MERWE et al., 1965 b).

Im Ententest hat sich das Ochratoxin A nach neueren Untersuchungen allerdings erst in einer zehnfach höheren Konzentration als das Aflatoxin B_1 als tödlich für Küken erwiesen (PURCHASE und WEL, 1967). Im Hühnerembryotest zeigte es dagegen in einer zweihundertfach höheren Konzentration an (s.Tab. 7). Da aber auch die Mengen vom Ochratoxin A größer sein sollen, die von toxinogenen Stämmen beim Verderb von Lebens- und Futtermitteln gebildet werden (FRANK, 1970), fällt der Befund, daß mit dem Hühnerembryotest bei Zugrundelegung der LD_{50} erst Toxinmengen von > 2 ppm nachweisbar sind, vermutlich bei Routineuntersuchung nicht allzu sehr ins Gewicht. Wenn es jedoch gilt, auch noch bis zu einhundertfach kleinere Mengen des Toxins in einem Lebens- oder Futtermittelextrakt festzustellen, ist wegen der höheren Ochratoxin A-Empfindlichkeit von Einzellern dem Test mit Mikroorganismen der Vorzug zu geben (BROCE et al., 1970). Bei den übrigen geprüften Mykotoxinen dagegen, die sich nur in einer zehn- bis zwanzigfach höheren Konzentration als das Aflatoxin B_1 als toxisch für den Hühnerembryo erwiesen haben, dürfte der Hühnerembryotest als Methode der Wahl [illegible].

Nach den Ergebnissen der Überprüfung der Eignung des Hühnerembryotests für den Nachweis von Mykotoxinen kann eine Anzeige von 0,1 - 0,2 ppm von den Toxinen Sterigmatocystin, Diacetoxyscirpenol und den Aflatoxinen G_1 und B_2 erwartet werden, wenn die Testung sich nach den LD_{50}-Werten dieser Toxine orientiert. Bei Aflatoxin B_1 können damit sogar Mengen von 0,01 ppm bestimmt werden. Bei der Zugrundelegung der LD_{100} statt der LD_{50} müssen von diesen Toxinen die doppelten Mengen in einem Lebensmittel oder einem Futtermittel vorliegen, nämlich 0,2 ppm von Aflatoxin B_2 und Diacetoxyscirpenol, 0,4 ppm von Aflatoxin G_1 und Sterigmatocystin, 0,2 ppm von Aflatoxin B_1.

Verglichen mit der Anzeige bei der Anwendung physikalisch-chemischer Verfahren ist die Empfindlichkeit des Hühnerembryotests geringer, vorausgesetzt, daß die LD_{50} oder LD_{100} der Beurteilung zugrunde gelegt wird. Das trifft vor allem für die Aflatoxine B_1 und G_1 zu, mit deren Auftreten in erster Linie hierzulande in verpilzten Lebens- oder Futtermitteln zu rechnen (FRANK, 1966, 1968 a, 1969 b, 1970; BÖSENBERG und EBERHARDT, 1969; HANSEL, 1968, 1969; GEDEK, 1969) ist. Dafür dürften aber Fehlbeurteilungen bei der Anwendung des Hühnerembryotests seltener vorkommen als bei dünnschichtchromatischen Nachweisen, bei welchen sehr viele nicht toxische Stoffe mit annähernd gleichen Rf-Werten ein Ergebnis verfälschen können (JOST und NICOLET, 1969; GEDEK, unveröffentlicht). Bei Berücksichtigung der Dosis letalis minima (LD_5), die außer der LD_{100} und der LD_{50} von den einzelnen im Hühnerembryo anzeigenden Toxine zum Vergleich ermittelt wurde, übertrifft die Empfindlichkeit der Methode beim Aflatoxin B_1 und Sterigmatocystin sogar die dünnschichtchromatographischen Verfahren (PONS et al., 1966; VORSTER, 1969; SCOTT et al., 1970; STACK und RODRICKS, 1971; STOLOFF et al., 1971). Bei Ochratoxin A, Aflatoxin B_2, G_1 und G_2 zeigt der Hühnerembryotest bei einer Orientierung nach der

LD_5 nur in einer etwa zehnfach höheren Konzentration als die für den Nachweis empfohlenen physikalisch-chemischen Multibestimmungsteste für Mykotoxine an (VORSTER, 1969; SCOTT et al., 1970; STOLOFF et al., 1971). Bei Diacetoxyscirpenol übertrifft die Anzeige im Hühnerembryotest allgemein die anderen Verfahren (ABEDI und SCOTT, 1969; STOLOFF et al., 1971). Bei einem Vergleich mit den anderen, biologischen Nachweisverfahren schneidet der Hühnerembryotest in bezug auf Empfindlichkeit noch besser ab. Da als LD_{50} beim Aflatoxin B_1 ein 0,05 µg Wert pro Ei ermittelt wurde, ist die Anzeige dieses Toxins im Hühnerembryotest nicht geringer als bei der Verwendung anderer biologischer Testobjekte, die bereits besprochen wurden. Eine vergleichbare Leistungsfähigkeit ist im Hinblick auf die Möglichkeit, mehrere Schimmelpilzgifte mit einem einheitlichen Verfahren nachzuweisen, nur noch vom Test mit Zellen tierischer oder menschlicher Gewebe zu erwarten.

Nachteilig bei der routinemäßigen Anwendung des Hühnerembryotests dürfte sich erweisen, daß der Test nicht spezifisch ist und zwanzig Tage dauert. An Spezifität mangelt es aber auch allen bisher für den biologischen Nachweis von Mykotoxinen entwickelten Testverfahren (s.S. 39).

Da jedoch die LD_{100}- und die LD_{50}-Werte bei den wichtigsten Mykotoxinen wie Aflatoxin B_1, Aflatoxin G_1, Ochratoxin A, Sterigmatocystin und Diacetoxyscirpenol teilweise recht weit auseinanderliegen, dürfte es kaum Überschneidungen im Hühnerembryotest geben, zumal vor der Anwendung des Tests immer erst eine Extraktion aus einem Lebens- oder Futtermittel erfolgen muß und die Wahl des Extraktionsverfahren sich immer danach richten wird, auf welches Mykotoxin untersucht werden soll.

B. Versuche mit Extrakten aus verpilzten Futtermischungen

Nachdem der Nachweis erbracht werden konnte, daß die stärkeren Hepatotoxine von den geprüften Schimmelpilzgiften im Hühnerembryotest auch dann noch anzeigen, wenn die LD_{50} für Laboratoriumstiere tausendfach oder mehr unterschritten wird, kommt diesem Test praktische Bedeutung zu (BROWN und ABRAMS, 1965; BUTLER, 1970; GEDEK und HOFMANN, 1970 b; VAN DER WATT und PURCHASE, 1970; PECKHAM et al, 1971).

Da sich bei den vorangegangenen Experimenten abermals eindeutig gezeigt hat, daß das Aflatoxin B_1 in der Toxizität durch kein anderes Schimmelpilztoxin übertroffen wird, ist die Feststellung dieses Mykotoxins in Lebens- und Futtermitteln wegen der besonders hohen Giftigkeit von allergrößter Wichtigkeit.

Deshalb wurde überprüft, ob es möglich ist, Aflatoxin B_1 mit Hilfe des Hühnerembryotests nachzuweisen, wenn es beispielsweise im Futtermittelextrakt vorliegt. Dabei mußten sich die vom Futtermittel herrührenden und bei der Extraktion in den Auszug gelangenden Stoffe weitgehend als unschädlich für den Hühnerembryo erweisen.

1. Material und Methodik

Ausgewählt für diese Teste wurden Geflügelfuttermischungen, da sie die größte Vielfalt an Ingredenzien enthalten, die einen solchen Test beeinflußen können. Abgesehen davon hat sich auch gezeigt, daß Mischfutter für Geflügel hinsichtlich des Gehaltes an Aflatoxin B_1 bei Anwendung dünnschichtchromatischer Verfahren besonders schwierig zu beurteilen sind. Das ist darauf zurückzuführen, daß derartige Futtermischungen im ungleich größeren Umfang als andere Futter-

mittel aflatoxinvortäuschende Substanzen enthalten können (GEDEK, unveröffentlicht). Um Fehlbeurteilungen auszuschalten, ist ein ergänzender Test mit einem biologischen Nachweisverfahren deshalb hier besonders angezeigt.

Es wurden 15 Futtermischungen geprüft, bei denen bei vorheriger dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Extrakte auf Grund einer Fluoreszenz von bestimmter Intensität im Vergleich zu einer Aflatoxin B_1/G_1 Standardlösung der Firma RÖTH, Karlsruhe ein bestimmter Gehalt an Aflatoxin B_1 geschätzt worden war.

Für die Prüfung im Hühnerembryotest wurden erneut Extrakte von diesen Futtermischungen hergestellt und dazu das Verfahren von PONS et al. (1966) angewendet. Dabei wurde jeweils von 50 g Untersuchungsmaterial ausgegangen und dieses fein gemahlen zunächst mit 250 ml wässerigem 70 %-igen Aceton und Glasperlen 30 Minuten lang unter ständigen Schütteln extrahiert. Nach Entfernung der groben Futtermittelteile durch Filtration durch einen Filter mit einem Filterpapier, Schleicher & Schüll Nr. 597, wurden 150 ml des Extraktes mit 200 ml 20 %-iger Bleiacetatlösung und 60 ml Aqua dest. versetzt und das Ganze im Wasserbad auf 150 ml eingeengt, im Eisbad auf 20 °C abgekühlt, durch einen Büchnertrichter mit Papierfilter , Schleicher & Schüll Nr. 595, geschickt und die in einem Kolben aufgefangene Flüssigkeit im Scheidetrichter zweimal mit jeweils 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Dabei wurde jeweils die untere Phase mit dem $CHCl_3$ abgetrennt und diese im Rotationsverdampfer auf 2 - 3 ml eingeengt. Durch anschließende Säulenchromatographie mit 100 ml Diäthyläther und nachfolgend mit 150 ml 3 % Methanol enthaltendem Chloroform erfolgte eine Entfettung und weitere Reinigung des Extraktes, welcher dann abermals im Rotationsverdampfer auf 2 - 3 ml eingeengt wurde und schließlich bis zur beginnenden Trockne

durch Abdampfen unter Stickstoff vom Chloroform befreit wurde.

Zur Durchführung des Hühnerembryotests wurde der Extrakt wegen spezieller guter Löslichkeit des Aflatoxin B_1 in Propylenglykol überführt. Die dazu jeweils verwendete Menge richtete sich nach dem vorausberechneten, vermutlichen Aflatoxin B_1-Gehalt der Probe und nach der von VERRETT et al. (1964) als unschädlich für den Hühnerembryo ermittelten Konzentration. Als Verdünnungsmittel wurde wiederum wie bei den Versuchen mit gereinigten Mykotoxinen steriles Aqua dest. genommen und dabei einkalkuliert, daß pro Testreihe 2 ml Impfmaterial und 2 ml zur Herstellung einer Verdünnungsreihe erforderlich sind. Eine Verdünnung der in Propylenglykol und Aqua dest. aufgenommenen Extrakte wurde jeweils im Verhältnis 1:2 vorgenommen. Die verschiedenen Konzentrationen, die sich daraus für jeden Futtermittelextrakt ergaben, gehen aus Tabelle 8 hervor. Dabei wurden auch zur besseren Beurteilung eines Tests mit mehreren Testreihen zu je 20 Eiern vermutliche Aflatoxin B_1-Mengen pro Ei mitgeprüft, die unterhalb der für das Toxin ermittelten LD_{100} bzw. LD_{50} lagen.

Zur Feststellung, ob andere, vom Futtermittel stammende Stoffe als Aflatoxin B_1 bei der direkten Verimpfung des Extraktes auf das Hühnerei das Testergebnis beeinflußen können, wurden Extrakte von Futtermischungen, die sich dünnschichtchromatographisch als frei von Aflatoxinen und aflatoxinvortäuschenden Substanzen erwiesen hatten, mit einer bestimmten Menge gereinigten Aflatoxin B_1 versetzt und davon wie bei den vorangegangenen Versuchen, abgestufte Konzentrationen von Aflatoxin B_1 und Futtermittelextrakt im Hühnerembryotest geprüft. Die Dosierung pro Ei von nachträglich dem Extrakt zugefügten Aflatoxin B_1 wurde den ermittelten LD_{100}- und LD_{50}- Werten angepaßt (s.Tab. 8).

Tabelle 8: Im Hühnerembryotest geprüfte Futtermittelextrakte

Nr. des Extraktes	Schimmelpilzgehalt pro g Futtermischung	Dünnschichtchromatographisch ermittelter Aflatoxin B_1-Gehalt in ppm	Impfdosis pro Ei in µg
1	$1{,}8 \times 10^5$	0,067	a) 0,074 b) 0,037
2	$1{,}3 \times 10^5$	0,1	a) 0,1 b) 0,05
3	$5{,}0 \times 10^4$	0,111	a) 0,12 b) 0,06
4	$1{,}0 \times 10^5$	0,067	a) 0,074 b) 0,037
5	$5{,}0 \times 10^3$	0,044	a) 0,05 b) 0,025 c) 0,012
6	$1{,}7 \times 10^4$	0,133	a) 0,166 b) 0,08 c) 0,04
7	$1{,}0 \times 10^4$	0,08	a) 0,08 b) 0,04 c) 0,02
8	nicht bestimmt	0,133	a) 0,148 b) 0,074 c) 0,037 d) 0,018

Fortsetzung Tabelle 8:

Nr. des Extraktes	Schimmelpilzgehalt pro g Futtermischung	Dünnschichtchromatographisch ermittelter Aflatoxin B_1-Gehalt in ppm	Impfdosis pro Ei in ug
9	$2,0 \times 10^4$	0,333	a) 0,37 b) 0,18 c) 0,09 c) 0,04
10	$7,0 \times 10^4$	0,111	a) 0,123 b) 0,061 c) 0,03 d) 0,01
11	$6,0 \times 10^4$	0,111	a) 0,123 b) 0,061 c) 0,03 d) 0,01
12	$\leq 10^2$	0,033	a) 0,03 b) 0,01 c) 0,005 d) 0,002
13	$5,0 \times 10^4$	0,067	a) 0,064 b) 0,032 c) 0,016 d) 0,008
14	$2,0 \times 10^3$	0,2	a) 0,2 b) 0,1 c) 0,05 d) 0,02

Fortsetzung Tabelle 8:

Nr. des Extraktes	Schimmelpilzgehalt pro g Futtermischung	Dünnschichtchromatographisch ermittelter Aflatoxin B_1-Gehalt in ppm	Impfdosis pro Ei in µg
15	$1{,}3 \times 10^5$	0,167	a) 0,167 b) 0,083 c) 0,041 d) 0,020
16	$3{,}0 \times 10^4$	0	a) 0,2+) b) 0,1+) c) 0,05+)
17	$1{,}0 \times 10^4$	0	a) 0,2+) b) 0,1+) c) 0,05+)

+) nach Zusatz von gereinigten Aflatoxin B_1

Die Durchführung der einzelnen Teste mit insgesamt 17 verschiedenen Futtermittelextrakten erfolgte entsprechend der im vorangegangenen Kapitel A beschriebenen Methode (s.S.59). Die Bewertung der einzelnen Tests wurde dabei stets im Vergleich einer Kontrollreihe vorgenommen, an die nur das reine Lösungsmittel und das Verdünnungsmittel Aqua dest. verabfolgt worden war.

2. Ergebnisse

Bei keinem der 15 Futtermittelextrakte, die Aflatoxin B_1 verdächtige Stoffe aufgewiesen hatten und bei denen aus der Intensität in der Fluoreszenz im Vergleich zu einer Aflatoxin B_1/G_1-Standardlösung auf einen bestimmten für den Hühnerembryo toxischen Gehalt an Aflatoxin B_1 geschlossen worden war, ergab sich bei der Prüfung im Hühnerembryotest ein Hinweis auf eine Toxizität der Extrakte. Bei Zusatz von Aflatoxin B_1 in Konzentrationen der ermittelten LD_{100} und LD_{50} zu zwei Futtermittelextrakten ohne Aflatoxin B_1 oder ähnliche Substanzen betrug die Absterberate in allen sechs Testreihen 100 %.

3. Besprechung der Ergebnisse

Es zeigte sich bei diesen Testen, daß nicht einmal 0,1 ml eines 1 g Futter entsprechenden Extraktes gegenüber Hühnerembryonen eine toxische Wirkung entfaltet, denn die Teste ergaben keine Abweichung von den nur mit Lösungs- und Verdünnungsmittel beimpften Testreihen. Dies könnte zu der Schlußfolgerung verleiten, daß sich die bei der Extraktion eines Futtermittels in den Extrakt gelangenden Stoffe in ihrer Wirkung kompensieren, so daß die Giftwirkung des Aflatoxin B_1 bei dieser Versuchsanordnung aufgehoben wird.

Gegen diese Möglichkeit spricht aber das Testergebnis, welches erzielt wurde, als Futtermittelextrakten Aflatoxin B_1 in den für den Hühnerembryo tödlichen Dosierungen zugesetzt wurden. Hierbei aber war nämlich die Toxizität des Aflatoxin B_1 im Vergleich zu den vorangegangenen Testen mit reinem Aflatoxin B_1 und Dimethylformamid als Lösungsmittel (s.S.63) stärker, denn in Gegenwart von 0,05 µg pro Ei Aflatoxin B_1 hätte die Absterberate nur 50 % statt 100 % betragen dürfen. Es ist daher anzunehmen, daß bei Verimpfung eines tatsächlich Aflatoxin B_1-haltigen Futtermittelextraktes dessen Wirkung auf den Hühnerembryo durch die aus Futtermitteln stammenden Begleitstoffe potenziert werden kann. Da sich daraus für den Test Unsicherheitsfaktoren ableiten, die auch für die anderen Mykotoxine zutreffend sein können, empfiehlt es sich, den Hühnerembryotest erst nach der dünnschichtchromatischen Auftrennung einzusetzen und anstelle des zu prüfenden Lebensmittel- oder Futtermittelextraktes nur die toxinverdächtigen Eluate zu verimpfen, wie dies bereits zur Absicherung eines dünnschichtchromatischen Ergebnisses in der Literatur für das Aflatoxin B_1 angegeben wird (FISCHBACH, 1969; GOLDBLATT, 1969; EDITORAL, 1970).

Durch die Ermittlung der LD_{100}- und der LD_{50}-Werte für weitere Mykotoxine im Rahmen dieser Arbeit ist es möglich geworden, bei der Anwendung von physikalisch-chemischen Multibestimmungsnachweisen (VORSTER, 1969; SCOTT et al., 1970; STOLOFF et al., 1971; u.a.) die Ergebnisse in Zukunft auch bei den Hepatotoxinen, Sterigmatocystin, Diacetoxyscirpenol, Ochratoxin A sowie Aflatoxinen G_1, G_2 und B_2 durch Verimpfung von Eluaten auf das Hühnerei zu überprüfen.

IV. Zusammenfassung

Neun bei Mensch und Tier vor allem als Lebergifte wirkende Mykotoxine Lebens- und Futtermittel besiedelnder Schimmelpilze wurden hinsichtlich ihrer akuten Toxizität gegenüber Hühnerembryonen getestet. Hierbei fand mit geringen Abweichungen in bezug auf Lösungsmittel, Impfdosis und Auswertung der Testreihen der Hühnerembryotest nach VERRETT et al. (1964) Anwendung.

Es zeigte sich, daß wegen zu geringer Empfindlichkeit des Testobjektes dieser Test für den Nachweis von Rubratoxin B und Byssochlaminsäure nicht geeignet ist. Dagegen wurden von den Aflatoxinen B_1, B_2, G_1 und G_2 sowie von Sterigmatocystin, Diacetoxyscirpenol und Ochratoxin A bei der Applikation über die Luftkammer LD_{100}- und LD_{50}-Werte erhalten, die eine Empfehlung des Tests als Routineverfahren rechtfertigen. Da aber gleichzeitig spezifische, die toxische Wirkung eines bestimmten Mykotoxin charakterisierende Veränderungen an den Embryonen nicht nachgewiesen werden konnten, übertrifft das Verfahren die bisher für den Mykotoxinnachweis erarbeiteten biologischen Methoden nur hinsichtlich der Empfindlichkeit

Bei Berücksichtigung der LD_5-Werte reicht die Empfindlichkeit des Tests an die Nachweisbarkeitsgrenze physikalisch-chemischer Nachweisverfahren heran. Bei Zugrundelegung der LD_{50}-Werte sind mit dem Hühnerembryotest von Diacetoxyscirpenol und Aflatoxin B_2 0,1 ppm, von Sterigmatocystin und Aflatoxin G_1 0,2 ppm, von Aflatoxin G_2 1 ppm, von Ochratoxin A 2 ppm und von Aflatoxin B_1 0,01 ppm als kleinste Mengen nachweisbar.

Bei einer direkten Verimpfung von Futtermittelextrakten

zeigen aflatoxinvortäuschende Substanzen im Hühnerembryotest nicht an, so daß der Test auch zur Bestimmung der Aflatoxinfreiheit eines Futtermittels herangezogen werden kann. In Gegenwart von Aflatoxin B_1 verstärken die Begleitstoffe jedoch dessen Toxizität, so daß zur exakten Bestimmung der Verimpfung von Eluaten gegenüber einem vorher nicht dünnschichtchromatographisch aufgetrennten Futtermittelextrakt der Vorzug zu geben ist.

Ein besonderer Vorteil in der Anwendung des Hühnerembryotests ist zu sehen in der im Gegensatz zum Ententest jahreszeitlich nicht begrenzten Verwendungsfähigkeit. Als Nachteil gegenüber anderen biologischen Nachweisverfahren ist die Versuchsdauer von 20 Tagen anzuführen.

IV. Summary

Nine mycotoxins, present in food and feed, known to be toxic to the liver of men and animals, were tested for their toxicity against chicken embryos. Except for insignificant changes concerning inoculation doses, solvent used and the evaluation of the results, in general the method of VERRETT et al. (1964) was applied.

This test has proven to be not suitable for the detection of rubratoxin B and byssochlamic acid because of the very low sensitivity of the test object against these toxins. On the contrary the injection method via the air cell route is recommendable for a routine test because the LD_{100} and LD_{50} values of the aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2, sterigmatocystin, diacetoxyscirpenol and ochratoxin A are being obtained. This method is superior in sensitivity of other biological methods, at the same time does not exhibit the specific toxic effects typical for one of the tested mycotoxins.

In regard to the LD_5 values the sensitivity of this method comes close to the other physicochemical test methods. On the basis of the LD_{50} values the quantities of 0,1 ppm diacetoxyscirpenol and aflatoxin B_2, 0,2 ppm sterigmatocystin and aflatoxin G_1, 1 ppm aflatoxin G_2, 2 ppm ochratoxin A and 0,01 ppm aflatoxin B_1 can be detected in the chicken embryo method.

By direct injections of feedstuff extracts, aflatoxin like substances cannot be detectable using the chicken embryo test, therefore this test is suitable as an aflatoxin exclusion test in the examination of feedstuff. The toxicity of aflatoxin B_1 is higher in the presence of feedstuff extracts. Therefore it is preferable to use eluates in the chicken embryo test instead of feed extract preparations wh

has not been previously tested by thin layer chromatography.

The chicken embryo test has the advantage over the duckling assay because of the seasonal difficulties in obtaining test material of the latter. However, the chicken emboryo method has the technical disadvantage of a 20 day test duration period.

V. Literaturverzeichnis

Abedi, Z. H. and W. P. Mc Kinley (1968): Zebrafish eggs and larvae as aflatoxin bioassay test organisms. J. Ass. off. analyt. Chem. 51, 99[illegible] - 1005

Abedi, Z. H. and P. M. Scott (1969): Detection of toxicity of aflatoxins, sterigmatocystin and other fungal toxins by lethal actions on zebrafish larvae. J. Ass. off. analyt. Chem. 52, 963 - 969

Aleksandrowicz, J., B. Smyk, M. Czachor and Z. Schiffer (1970): Mycotoxins in aplastic and proliferative blood-diseases. Lancet 1, 43

Allcroft, R. and R. B. A. Carnaghan (1963): Toxic products in groundnuts. Biological effects. Chemy. Ind. 12, 50 - 53

Allcroft, R., H. Rogers, G. Lewis, J. Nabney and P. E. Best (1966): Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the "milk toxin". Nature (Lond.) 209, 154 - 155

Alpert, E., A. Serck-Hanssen and B. Rajagopolan (1970): Aflatoxin - induced hepatic injury in the African monkey. Arch. Environ Health 20, 723 - 728

Amonkar , S. V. and K. K. Nair (1965): Pathogenicity of Aspergillus flavus LINK to musca domestica nebulo FABRICIUS. J. invertebr. Path. 7, 8, 513 - 514

Annau, E., A. H. Corner, S. E. Magwood and R. Jericho (1964): Electrophoretic and chemical studies on sera of swine following the feeding of toxic groundnut meal. Canad. J. comp. Med. 28, 264 - 269

Armbrecht, B. H. and O. G. Fitzhugh (1964): Mycotoxins. II. The biological assay of aflatoxin in peking white ducklings. Toxicol. appl. Pharmacol. 6, 421 - 426

Armbrecht, B. H., G. H. Bierbower and P. C. Underwood (1965): Experimental aflatoxicosis in peking white ducklings and Coturnix quails. Toxicol. appl. Pharmacol. 7, 478

Arai, T., T. Ito and Y. Koyama (1967): Antimicrobial activity of aflatoxins. J. Bact. 93, 59 - 64

Asao, T., G. Büchi, M. M. Abdel-Kader, S. B. Chang, E. L. Wick and G. N. Wogan (1963): Aflatoxins B_1 and G_1. J. Amer. Chem. Soc. 85, 1706 - 1707

Ashley, L. M., J. E. Halver, W. K. Gardner and G. N. Wogan (1965): Crystalline aflatoxin cause trout hepatoma. Fed. Proc. 24, 627

Asplin, F. D. and K. B. A. Carnaghan (1961): The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. Vet. Rec. 73, 1215 - 1218

Babunmi, E. A. and O. Bassir (1969): The effect of aflatoxin on blood clotting in the rat. Brit. J. Pharmacol. 37, 497 - 500

Bailey, W. S. and A. H. Groth (1959): The relationship of hepatitis X of dogs and moldy corn poisoning of swine. J. Amer. vet. med. Ass. 134, 514 - 516

Baldwin, J. E., D. H. R. Barton, J. L. Bloomer, L. M. Jackmann, L. Rodriguez-Hahn and J. K. Sutherland (1962): The constitution of glauconic, glaucanic and byssochlamic acids. Experientia 18, 345 - 352

Bamburg, J. R., W. F. Marasas, M. V. Riggs, E. B. Smalley and F. M. Strong (1968): Toxic spiroepoxy compounds from Fusaria and other Hyphomycetes. Biotechnol. Bioeng. 10, 445 - 455

Bamburg, J. R., F. M. Strong and E. B. Smalley (1969): Toxins from moldy cereals. J. Agr. Food. Chem. 17, 443 - 450

Banes, D. (1966): Food toxins of fungal origin, methodology and regulatory aspects. J. Food Technol. 20, 755 - 756

Barnes, J. M. and W. H. Butler (1964): Carcinogenic activity of aflatoxin to rats. Nature (Lond.) 202, 1016

Barnes, J. M. (1970): Aflatoxin as a health hazard. J. appl. Bact. 33, 285 - 298

Bauer, L., H. R. Burmeister und L. Leistner (1968): Methodik zum qualitativen und quantitativen Aflatoxin Nachweis mit chemischen und biologischen Verfahren. Fleischwirtschaft 11, 1459

Bauer, L. und L. Leistner (1969): Die Wirkung von Aflatoxin B_1 auf Amöben. Arch. Hyg. Bakt. 153, 397 - 402

Bauer, L. und E. Müller (1970): Aflatoxin - induzierte nukleolare Kappen in Molluskenzellen. Naturwissenschaften 57, 457 - 458

Beard, R. L. and G. S. Walton (1965): An Aspergillus toxin lethal to larvae of the house fly. J. invertebr. Path. 7, 522 - 523

Birkinshaw, J. H. and I. M. H. Hammady (1957): Studies in the biochemistry of microorganisms.99. Metabolic products of Aspergillus versicolor (VUILLEMIN) TIRABOSCHI. J. Biochem. 65, 162 - 165

Black, H. S. and A. M. Altschul (1965): Gibberellic acid-induced lipase and α-amylase formation and their inhibition by aflatoxin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 661 - 664

Blount, W. P. (1961): Turkey "X" disease. Turkeys 9, 52 - 61

Bodin, E. and L. Gautier (1906): Note sur une toxine produite par l Aspergillus fumigatus. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 20, 209

Bösenberg, H. (1969): Zur Bedeutung der Aflatoxine. Naturwissenschaften 56, 350 - 352

Bösenberg, H. und E. Eberhardt (1969): Untersuchungen über den Verderb von Lebensmitteln durch Schimmelpilze in Supermärkten. Medizin Ernährung 10, 12 - 13

Bösenberg, H. (1970 a): Wirkung und Bedeutung der Mykotoxine. Zbl. Bakt. I. Orig. 212, 222 - 224

Bösenberg, H. (1970 b): Untersuchungen über den Nachweis von Aflatoxinen. Arzneimittelforschung 20, 1. Mitteil. 1157 - 1167, 2. Mitteil., 1521 - 1528

Brian, P. W., A. W. Dawkins, J. F. Grove, H. G. Hemming, D. Lowe and G. L. F. Nowis (1961): Phytotoxic compounds produced by Fusarium equiseti. J. exper. Bot. 12, 1 - 12

Broce, D., R. M. Grodner, R. L. Killebrew and F. L. Bonner (1970): Ochratoxins A and B confirmation by microbiological assay using Bacillus cereus mycoides. J. Ass. off. analyt. Chem. 53, 616 - 619

Brown, A. and G. Smith (1957): The genius Paecilomyces Bainier and its perfect stage Byssochlamys WESTLING. Trans. Brit. Mycol. Soc. 40, 17 - 89

Brown, J. M. M. and L. Abrams (1965): Biochemical studies on aflatoxicosis. Onderstepoort J. vet. Res. 32, 119 - 146

Brown, R. F., J. D. Wildman and R. M. Eppley (1968): Temperature-dose relationships with aflatoxin on the brine shrimp Artemia salina. J. Ass. off. analyt. Chem. 51, 905 - 906

Brown, R. F. (1969): The effect of some mycotoxins on the brine shrimp Artemia salina. J. Amer. Oil Chem. Soc. 46, 119

Bullerman, L. B. and J. C. Ayres (1968): Aflatoxin producing potential of fungi isolated from cured and aged meats. Appl. Microbiol. 16, 1945 - 1946

Bullerman, L. B., J. C. Ayres and P. A. Hartman (1969): Aflatoxin production in meats. Appl. Microbiol. 18, 714 - 717

Bullock, E. J. and J. G. Underwood (1962): Studies in mycological chemistry. The structure of isosterigmatocystin and an amended structure for sterigmatocystin. J. Chem. Soc. 4179 - 4183

Burmeister, H. R. and C. W. Hesseltine (1966): Survey of the sensitivity of microorganisms to aflatoxin. Appl. Microbiol. 14, 403 - 404

Burnside, J. E., W. L. Sippel, J. Forgacs, W. T. Carll, M. B. Atwood and E. R. Doll (1957): A disease of swine and cattle caused by eating moldy corn. II. Experimental production with pure cultures of molds. Amer. J. Vet. Res. 18, 817 - 824

Butler, W. H. and J. M. Barnes (1963): Toxic effects of groundnut meal containing aflatoxin to rats and guinea pigs. Brit. J. Cancer 17, 699 - 710

Butler, W. H. (1964): Acute toxicity of aflatoxins in rats. Brit. J. Cancer 18, 756 - 762

Butler, W. H. (1966): Akute Toxizität von Aflatoxin B_1 beim Meerschweinchen. J. Path. Bact. 227 - 280 (1966). Ref.: Chem. Zbl. 138/26

Butler, W. H. and J. M. Barnes (1966): Carcinoma of the glandula stomach in rats given diets containing aflatoxin. Nature (Lond.) 209, 90

Butler, W. H. and J. S. Wigglesworth (1966): The effects of aflatoxin B_1 on the pregnant rat. Brit. J. exper. Path. 47, 242 - 247

Butler, W. H. (1970): Liver injury induced by aflatoxin. Progr. Liver Dis. 3, 408 - 418

Campbell, T. C., J. P. jun. Caedo, J. Bulatao-Jayme, L. Salamat and R. W. Engel (1970): Aflatoxin M_1 in human urine. Nature (Lond.) 227, 403 - 404

Campbell, A. D. and J. T. Funkhouser (1966): Collaborative study on the analysis of aflatoxins in peanuts butter. J. Ass. off. analyt. Chem. 49, 730 - 739

Campbell, A. D. (1968): Analytical methods for several mycotoxins associated with foods. Proc. 1967, Mycotoxin research seminar, washington, 47 - 50

Carlton, W. W., J. Tuite and P. Mislivec (1968): Investigation of the toxic effects in mice of certain species of penicillium. Toxicol. appl. Pharmacol. 12, 372 - 387

Carnaghan, R. B. A., R. D. Hartley and J. O'Kelly (1963): Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. Nature (Lond.) 200, 1101

Carnaghan, R. B. A. (1967): Hepatic tumors and other chronic liver changes in rats following a single oral administration of aflatoxin. Brit. J. Cancer 21, 811 - 814

Chaffee, V. W., G. T. Edds, J. A. Himes and F. C. Neal (1969): Aflatoxicosis in dogs. Amer. J. Vet. Res. 30, 1737 - 1749

Cheung, K. K. and G. A. Sim (1964): Aflatoxin G_1: direct determination of the structure by the method of isomorphous replacement. Nature (Lond.) 201, 1185 - 1188

Choudhary, P. G. and S. L. Manjrekar (1967): Preliminary observations on biological activity of pure aflatoxin B_1 in chick embryos. Indian vet. J. 44, 543 - 548

Christensen, C. M. (1957): Deterioration of stored grains by fungi. Bot. Rev. 23, 108 - 134

Christensen, C. M., H. A. Fause, G. H. Nelson, F. Bates and C. W. Mirocha (1967): Microflora of black and red pepper. Appl. Microbiol. 15, 622 - 626

Christensen, C. M. and H. H. Kaufmann (1969): Grain stroge. The role of fungi in quality loss. Univ. of Minnesota Press, Minneapolis, 82 - 83

Ciegler, A., E. B. Lillehoj, R. E. Peterson and H. H. Hall (1966): Microbiological detoxification of aflatoxin. Appl. Microbiol. 14, 934 - 939

Ciegler, A. and E. B. Lillehoj (1968): Mycotoxins. Adv. appl. microbiol. 10, 155 - 219

Clegg, D. G. and N. Bryson (1962): An outbreak of poisoning in store cattle attributed to brazilian groundnut meal. Vet. Rec. 74, 992 - 994

Clegg, D. J. (1964): The hen egg in toxicity and teratogenicity studies. Food Cosmet. Toxicol. 2, 717 - 727

Clements, N. (1968 a): Note on a microbiological assay for aflatoxin B_1: a rapid confirmatory test by effects on groth of Bacillus megaterium. J. Ass. off. analyt. Chem. 51, 611 - 612

Clements, N. (1968 b): Rapid confirmatory test for aflatoxin B_1, using Bacillus megaterium. J. Ass. off. analyt. Chem. 51, 1192 - 1194

Clifford, J. T. and K. R. Rees (1967): The action of aflatoxin B_1 on rat liver. J. Biochem. 102, 65 - 75

Coursey, D. G. and H. O. W. Eggins (1961): Microorganismes responsables de l'huile de palme pendant le stockage. Oleagineux 16, 227 - 235

Dalezios, J. and G. N. Wogan (1971): Aflatoxin P_1: a new metabolite in monkeys. Science 171, 584 - 585

Damm, A. (1951): Eine neue, häufiger vorkommende Infektion des Süßmosts. Flüss. Obst 18, 23

Daniel, M. R. (1965): In vitro assay systems for aflatoxin. Brit. J. exper. Path. 46, 183 - 188

Davis, J. E., D. Kirkaldy and J. C. Roberts (1960): Studies in mycological chemistry VII. Sterigmatocystin, a metabolite of Aspergillus versicolor (VUILLEMIN) TIRABOSCHI. J. Chem. Soc. 2169 - 2178

Davis, N. D., J. W. Searcy and U. L. Diener (1969): Production of ochratoxin A by Aspergillus ochraceus in a semisynthetic medium. Appl. Microbiol. 17, 742 - 744

Dawkins, A. W., J. F. Grove and B. K. Tidd (1965): Diacetoxyscirpenol and some related compounds. Chem. Comm. 2, 27

Detroy, R. W. and C. W. Hesseltine (1968): Isolation and biological activity of a microbial conversion product of aflatoxin B_1. Nature (Lond.) 219, 967

Detroy, R. W. and C. W. Hesseltine (1969): Transformation of aflatoxin B_1, by steroid-hydroxylating fungi. Canad. J. Microbiol. 15, 495 - 500

Dickens, F. and H. E. H. Jones (1963): The carcinogenic action of aflatoxin after its subcutaneous injection in the rat. Brit. J. Cancer 17, 691 - 698

Dickens, F. and H. E. H. Jones (1965): Further studies on the carcinogenic action of certain lactones and related substances in the rat and mouse. Brit. J. Cancer 19, 392 - 403

Dickens, F., H. E. H. Jones and H. B. Waynforth (1966): Oral, subcutaneous and intratracheal administration of carcinogenic lactones and related substances: the intratracheal administration of cigarette tar in the rat. Brit. J. Cancer 20, 134 - 144

Diener, U. L. and N. D. Davis (1965): Toxin producing ability of Aspergillus flavus strains grown on peanuts and an artificial medium. Phytopathology 55, 497 - 498

Diener, U. L. and N. D. Davis (1966): Aflatoxin production by isolates of Aspergillus flavus. Phytopathology 56, 1390 - 1393

Di Paolo, J. A., J. Ellis and H. Erwin (1967): Teratogenic response by hamsters, rats and mice to aflatoxin B_1. Nature (Lond.) 215, 638 - 639

Dolimpio, D. A., C. Jacobsen and M. Legator (1968): Effect of aflatoxin on human leucocytes. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 127, 559 - 562

Dorp, D. A. van, A. S. M. van der Zijden, R. K. Beerthuis, S. Sparreboom, W. O. Ord, K. De Jong and H. Keuning (1963): Dihydroaflatoxin B, metabolite of Aspergillus flavus. Remarks on the structure of aflatoxin B. Rec. trav. chim. 82, 587 - 592

Doupnik, B. and J. C. Peckham (1969): Mycotoxicity of Aspergillus ochraceus to chicks. J. Amer. Oil Chem. Soc. 46, 122 A

Doupnik, B. and J. C. Peckham (1970): Mycotoxicity of Aspergillus ochraceus to chicks. Appl. Microbiol. 19, 594 - 597

Dutton, M. F. and J. G. Heathcote (1966): Two new hydroaflatoxins. J. Biochem. 1021, 21 - 22 p

Editoral, (1970): Official Methods of Analysis. 11th Edition, Washington, D. C., Sections 26001 - 26061

Edwards, G. S. and G. N. Wogan (1968): Acute and chronic toxicity of rubratoxin in rats. Fed. Proc. 27, 552

Elis, J. and J. A. Di Paolo(1967): Aflatoxin B_1, induction of malformations. Arch. Path. 83, 53 - 57

El-Khadem, M. G. Menke und F. Grossmann (1966): Schädigung von Erdnußkeimlingen durch Aflatoxine. Naturwissenschaften 53, 532

Engelbrecht, J. C. (1970): The effects of sterigmatocystin on primary cellculture. S. Afr. med. J. 44, 153 - 156

Engelbrecht, J. C. (1970): The effects of aflatoxin B_1 and sterigmatocystin on two different types of cellcultures. Symp. on Mycotoxins in Human Health Pretoria, Südafrika, 2. - 4. Sept.

Eppley, R. M. (1968): Screening method for zeralone, aflatoxin and ochratoxin. J. Ass. off. analyt. Chem. 51, [illegible]

Fere, C. (1893): Note sur l influence sur l'incubation de l oeuf de poule, d injections préables dans l'albumen, de solution de sel, de glucose, de glycerine. Compt. rend. Soc. biol. 45, 851

Ferreira, N. P. (1967): Recent advances in research on ochratoxin Part. 2. Microbiological aspects 157 - 168. In Mateles R. I. and G. N. Wogan, Biochemistry of some foodborne microbial toxins. M. I. T. Press, Cambridge, Mass. und London

Fischbach, H. (1969): Report of the Joint AOAC - AOCS Aflatoxin COMMITTEE. J. Ass. off. analyt. Chem. 52, 970 - 975

Fishbein, L. and H. L. Falk (1970): Chromatography of mold metabolites 1, Aflatoxins ochratoxins and related compounds. Chromatog. Rev. 12, 42 - 87

Flury, E., [illegible] of diacetoxyscirpenol. Chem. Comm. 26

Forgacs, J., H. Koch, W. T. Carll and R. H. White-Stevens (1958): Additional studies on the relationship of mycotoxicoses to the poultry haemorrhagic syndrome. Amer. J. Vet. Res. 19, 744 - 753

Forgacs, J. (1962 a): Mycotoxicoses. The neglected diseases. Feedstuffs 34/2, 124 - 134

Forgacs, J. (1962): Mycotoxicoses. In "Advances in veterinary science" Vol. 7. S. 273 - 382, Academic Press, New York

Foy, H., T. Gillmann, A. Kondi and J. K. Preston (1966): Hepatic injuries in riboflavin and pyridoxine deficient baboons possible relations to aflatoxin induced hepatic cirrhosis and carcinoma in Afrikans. Nature (Lond.) 212, 150 - 153

Franciscis, P. De and W. Landauer (1959): Combined effects of cortisone and insulin on developing chicken embryos. Nature (Lond.) 184, 101 - 103

Frank, H. K. (1966): Aflatoxine in Lebensmitteln. Arch. Lebensmittelhyg. 17, 237 - 242

Frank, H. K. (1967): Mykotoxine und ihre Produzenten. Med. Klin. 50, 1933 - 1941

Frank, H. K. (1968 a): Sind Mykotoxine in unserer Nahrung eine Gefahr? Therapiewoche 18, 1172

Frank, H. K. (1968 b): Vorkommen, Verbreitung und Eigenschaften von Karzinogenen bei Schimmelpilzen. Planta Medica, Suppl. 64 - 76

Frank, H. K. (1968 c): Diffusion of aflatoxin in foodstuffs. J. Food. Sci. 33, 98 - 100

Frank, H. K. und W. Eyrich (1968): Über den Nachweis von Aflatoxin und das Vorkommen aflatoxinvortäuschender Substanzen in Lebensmitteln. Zschr. Lebensmittel-Untersuchung 138, 1811

Frank, H. K. (1969 a): Nachweis von Aflatoxinen in Lebens- und Futtermitteln. Alimenta 8, 63 - 67

Frank, H. K. (1969 b): Die Bedeutung der Mykotoxine für die Lebensmittelindustrie. Alimenta 8, 67

Frank, H. K. (1970): Vorkommen und Nachweis von Mykotoxinen. Zbl. Bakt. I. Orig. 212, 216 - 21

Gabliks, J. (1965): Response of human liver cellcultures to carcinogens. Fed. Proc. 24, 1 - 3

Gabliks, J., W. Schaeffer, L. Friedman and G. N. Wogan (1965): Effect of aflatoxin B_1 on cellcultures. J. Bact. 90, 720 - 723

Gedek, B. (1969): Zur Bedeutung von Mykotoxinen. Die blauen Hefte f. den Tierarzt 41, 32 - 38

Gedek, B. und H. Hofmann, (1970 a): Tierexperimentelle Untersuchungen zur hepatotoxischen Wirkung von Schimmelpilzen. 1. Mitt. Akute Veränderungen beim Meerschweinchen. Zbl. Vet. Med. B 17, 658 - 666

Gedek, B. und H. Hofmann (1970 b): Tierexperimentelle Untersuchungen zur hepatotoxischen Wirkung von Schimmelpilzgiften. 2. Mitt. Chronische Veränderungen beim Meerschweinchen. Zbl. Vet. Med. B 17, 667 - 676

Gedek, B. (1971): Mykotoxine in Lebensmitteln und ihre Bedeutung für die Gesundheit des Menschen. Materia Medica Nordmark 23, 130 - 141

Gilgan, M. W., E. B. Smalley and F. M. Strong (1966): Isolation and partial characterization of a toxin from Fusarium tricinctum on moldy corn. Arch. Biochem. Biophy. 114, 1 - 3

Goerttler, K. (1962): Der teratologische Grundversuch am bebrüteten Hühnchenkeim, seine Möglichkeiten und Grenzen. Klin. Wschr. 40, 809 - 812

Goldblatt, L. A. (1969): Aflatoxin. Academic Press, New York und London

Green, S. (1968): Antineoplastic activity of aflatoxin B_1. Nature (Lond.) 220, 931 - 932

Griem, W. (1967): Ein Beitrag zur Durchführung von Toxizitätsprüfungen am bebrüteten Hühnerei. Klin. Wschr. 45, 318 - 319

Grosch, D. S. (1967): Poisoning with DDT. Effect on reproductive performance of Artemia. Science 155, 592 - 593

Grove, D. C. and W. A. Randall (1955): Assay methods of antibiotics. Medical Encyclopedia, Ind. New York

Gudauskas, R. T., N. D. Davis and U. L. Diener (1967): Sensitivity of Heliothis virescens larvae to aflatoxin in ad libitum feeding. J. invertebr. Path. 9, 132 - 133

Gumbmann, M. R., S. N. Williams, A. N. Booth, P. Vohra, R. A. Ernst and M. Bethard (1970): Aflatoxin susceptibility in various breeds of poultry. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 134, 683 - 688

Hamor, T. A., I. C. Paul, J. Nonteath Robertson and G. A. Sim (1962): The structure of byssochlamic acid. Experientia 18, 352 - 354

Hanssen, E. (1968): Ergebnisse der Untersuchung einiger Lebensmittel auf Aflatoxin B_1. Mitt. Bl. GDCH Fachgr. 22, 83 - 88

Hanssen, E. (1969): Schädigung von Lebensmitteln durch Aflatoxin B_1. Naturwissenschaften 56, 90

Harding, J. D., J. T. Done, G. Lewis and R. Allcroft (1963): Experimental groundnut poisoning in pigs. Res. Vet. Sci. 4, 217 - 229

Hartley, R. D., B. F. Nesbitt and J. O Kelley (1963): Toxic metabolites of Aspergillus flavus. Nature (Lond.) 198, 1056 - 1058

Hayes, A. W. and B. J. Wilson (1968): Bioproduction and purification of rubratoxin B. Appl. Microbiol. 16, 1163 - 1167

Hayes, A. W. and B. J. Wilson (1970): Effects of rubratoxin B on liver composition and metabolism in the mouse. Toxicol. appl. Pharmacol. 17, 481 - 492

Hayes, A. W. and E. P. Wyatt (1970): Survey of the sensitivity of microorganisms to rubratoxin B. Appl. Microbiol. 20, 164 - 165

Hedge, U. C., T. Chandra and E. R. B. Shanmugasundaram (1967): Toxicity of different diets contaminated with various fungi to rice moth larvae. Canad. J. comp. Med. 31, 160 - 162

Hedge, U. T. and E. R. B. Shanmugasundaram (1967): A study of krebs citric-acidcycle enzymes in rice moth larvae (Corcyra cephalonica St.) during mycotoxicosis. Canad. J. comp. Med. 31, 348 - 349

Hesseltine, C. W., O. L. Shotwell, J. J. Ellis and R. D. Stubblefield (1966): Aflatoxin formation by Aspergillus flavus. Bact. Rev. 30, 795 - 805

Hesseltine, C. W. (1969): Mycotoxins. Mycopath. Mycol. appl. 369 - 383, 29. Dezember

Hodges, F. A., J. R. Zust, H. R. Smith, A. A. Nelson, B. H. Armbrecht and A. D. Campbell (1964): Mycotoxins: aflatoxins isolated from Penicillium puberulum. Science 145, 1439

Holzapfel, C. W., P. S. Steyn and I. F. H. PURCHASE (1966): Isolation and structure of aflatoxin M_1 and M_2. Tetrahedron Letters 25, 2799 - 2803

Holzapfel, C. W., I. F. H. Purchase, P. S. Steyn, L. Gouws (1966): The toxicity and chemical assay of sterigmatocystin a carcinogenic mycotoxin and its isolation from two new fungal sources. S. Afr. Med. J. 40, 1100 - 1101

Holzapfel, C. W., I. F. H. Purchase, P. S. Steyn and L. Gouws (1967): Acute toxicity of sterigmatocystin. Food Cosmet. Toxol. 5, 586

Ikawa, M., D. S. Ma, G. B. Meeker and R. P. Davis (1969): Use of Chlorella in mycotoxin and phycotoxin research. J. Agr. Food Chem. 17, 425 - 429

Iongh, H. De., R. K. Beerthuis, R. O. Vles, C. B. Barrett and W. O. Ord (1962): Investigation of the factor in groundnut meal responsible for "turkey X disease". Biochim. biophys. Acta 65, 548 - 551

Iongh, H. De, R. O. Vles and J. G. van Pelt (1964): Milk of animals fed an aflatoxin containing diet. Nature (Lond.) 202, 466 - 467

Iongh, H. De, R. O. Vles and P. De Vogel (1965): The occurence and detection of aflatoxin in food. In Mycotoxins in foodstuffs. In G. N. Wogan M. I. T. Press, Cambridge, Mass. 235 - 245

Israel, J. (1878): Neue Beobachtungen auf dem Gebiet der Mykosen des Menschen. Arch. path. Anat. 74, 16

Jayaraman, A., E. J. Herbst and M. Ikawa (1968): The bioassay of aflatoxin and related substances with Bacillus megaterium spores and chicken embryos. J. Amer. Oil Chem. Soc. 45, 700 - 702

Joffe, A. Z. (1960): The mycoflora of overwintered cereals and its toxicity. Bull. Res. Counc. Israel 9 D, 101 - 126

Joffe, A. Z. (1969): Aflatoxin produced by 1,625 isolates of Aspergillus flavus from groundnut kernels and soils in Israel. Nature (Lond.) 221, 492

Joffe, A. Z. and H. Ungar (1969): Cutaneous lesions produced by topical application of aflatoxin to rabbit skin. J. invest. Derm. 52, 504

Jost, R. und J. Nicolet (1969): Aflatoxinanalysen von Futtermitteln. Ergebnisse und Probleme. Path. Mikrobiol. 33, 296 - 307

Juhasz, S. and E. Greczi (1964): Extracts of mould - infected groundnut samples in tissue culture. Nature (Lond.) 203, 861 - 862

Karnofsky, D. A.,L. Ridgway and P. Patterson (1950): Production of achondroplasia in the chick embryo with thallium. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 73, 255

Karnofsky, D. A. and L. Ridgway (1952): Production of injury to the central nervous system of the chick embryo by lead salts. J. Pharmacol. exper. Therap. 104, 176 - 186

Kemper, F. (1962): Thalidomid und Entwicklung von Hühnerembryonen. Arzneimittelforschung 12, 640

Khera, K. S. and D. A. Lyon (1968): Chicks and duck embryos in the evaluation of pesticides activity. Toxicol. appl. Pharmacol. 13, 1 - 15

Koehler, B. and C. M. Woodworth (1938): Corn-seedling virescence caused by Aspergillus flavus and Aspergillus tamarii. Phytopathology 28, 811 - 823

Kulik, M. M. and C. E. Holaday (1966): Aflatoxin: a metabolic product of several fungi. Mycopath. Mycol. appl. 30, 137 - 140

Kühnert, M. und H. J. Buchheim (1968): Vorschlag zur dünnschichtchromatographischen Ermittlung von Mykotoxinen (besonders) Aflatoxin in Malzkeimfuttermitteln. Mh. Vet. Med. 23, 892 - 897

Kurata, H. and M. Ichinoe (1967): Studies on the population of toxigenic fungi in foodstuff II. Toxigenic determination for the fungal isolates obtained from the flour-type foodstuff. J. Food Hyg. Soc. Jap. 8, 247 - 252

Lai, M., G. Semeniuk and C. W. Hesseltine (1968): Nutrients affecting ochratoxin A production by Aspergillus spp. Phytopathology 58, 1056

Landers, K. E., N. D. Davis and U. L. Diener (1967): Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by Aspergillus flavus in peanuts. Phytopathology 57, 1086 - 1090

Lee, D. J., J. H. Wales and R. O. Sinnhuber (1969): Hepatoma and renal tubule adenoma in rats fed aflatoxin and cyclopropenoid fatty acids. J. Nat. Cancer Inst. 43, 1037 - 1041

Legator, M. S. and A. Withrow (1964): Aflatoxin: Effect on mitotic division in cultured embryonic lung cells. J. Ass. off. analyt. Chem. 47, 1007 - 1009

Legator, M. S., S. M. Zuffante and A. R. Harp (1965): Aflatoxin: Effect on cultured heteroploid human embryonic lung cells. Nature (Lond.) 208, 345 - 347

Legator, M. S. (1966): Biological effects of aflatoxin in cell culture. Bact. Rev. 30, 471 - 477

Legator, M. S. (1969): Mutagenic effects of aflatoxin. J. Amer. vet. med. Ass. 155, 2081 - 2083

Lie, J. L. (1967): Formation of aflatoxin in cheddar cheese by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. J. Dairy Sci. 50, 1708 - 1710

Lijinsky, W. and W. H. Butler (1966): Purification and toxicity of aflatoxin G_1. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 123, 151 - 154

Lillehoj, E. B., A. Ciegler and H. H. Hall (1967): Aflatoxin B_1 uptake by Flavobacterium aurantiacum and resulting toxic effects. J. Bact. 93, 464 - 471

Lillehoj, E. B. and A. Ciegler (1968): Biological activity of sterigmatocystin. Mycopath. Mycol. appl. 35, 373 - 376

Lilly, L. J. (1965): Induction of chromosome aberrants by aflatoxin. Nature (Lond.) 207, 433 - 434

Loosmore, R. M. and L. M. Markson (1961): Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal. Vet. Rec. 73, 813 - 814

Madhavan, T. V., R. K. Suryanarayana and P. G. Tulpule (1965): Effect of dietary protein level on susceptibility of monkeys to aflatoxin liver injury. Indian J. Med. Res. 53, 984 - 989

Madhavan, T. V., P. G. Tulpule and C. Gopalavan (1965): Aflatoxin induced hepatic fibrosis in Rhesus monkeys. Arch. Path. 79, 466 - 469

Marasas, W. F. O., E. B. Smalley, P. E. Degurse, J. R. Bamburg and R. E. Nichols (1967): Acute toxicity to rainbow trout (Salmo gairdneri) of a metabolite produced by the fungus Fusarium tricinctum. Nature (Lond.) 214, 817 - 818

Marliac, J.-P. and M. K. Mutchler (1963): Use of the chick embryo technique for detecting potentiating effects of chemicals. Fed. Proc. 22, 188

Matsumara, F. and St. G. Knight (1967): Toxicity and chemosterilizing activity of aflatoxin against insects. J. Econ. Entomol. 60, 871 - 872

Mc Donald, D. and C. Horkness (1965): Wachstum von Aspergillus flavus und Production von Aflatoxin bei Erdnüssen. 4. Mitt. Trop. Science 6, 12 - 27 (1964). Ref.: Chem. Zbl. 136, 6924

Mc Laughlin, J. and M. K. Mutchler (1962): Toxicity of some chemicals measured by injection into chicken embryos. Fed. Proc. 21, 450

Mc Laughlin, J., J.-P. Marliac, M. J. Verrett, M. K. Mutchler and O. G. Fitzhugh (1964): Toxicity of fourteen volatile chemicals as measured by the chick embryo method. Amer. Ind. Hyg. Ass. J. 25, 282 - 284

Merwe, K. J. van der, L. Fourie and B. De Scott (1963): On the structure of the aflatoxins. Chemy.Ind. 1660 - 1661

Merwe, K. J. van der, S. Steyn and L. Fourie (1965 a): Mycotoxins II. The constitution of ochratoxin A, B, C, metabolites of Aspergillus ochraceus WILH. J. Chem. Soc. 7083 - 7088

Merwe, K. J. van der, P. S. Steyn, B. De Scott and J. J. Theron (1965 b): Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by aspergillus ochraceus WILH. Nature (Lond.) 205, 1112 - 1113

Meyer, H. und H.-J. Rehm (1967): Zur Bildung der Byssochlaminsäure. Naturwissenschaften 54, 370

Meyer, H. und H.-J. Rehm (1969): Keimungs- und gärungshemmende Wirkung von Byssochlaminsäure. Naturwissenschaften 56, 563

Michael, A. S., C. G. Thompson and M. Abramowitz (1956): Artemia salina as a test organism for bioassay. Science 123, 464

Mislivec, B., J. H. Hunter and J. Tuite (1968): Assay for aflatoxin production by the genera Aspergillus and Penicillium. Appl. Microbiol. 16, 1053 - 1055

Moore, J. H. and B. Truelove (1970): Ochratoxin A. Inhibition of mitochondrial respiration. Science 168, 1102 - 1103

Morcos, S. R. and A. K. Lebshtein (1963): Protein and toxicity. The effect of different dietary levels of protein on the changes produced by the groundnut toxin in chicks. J. Arab. Vet. Med. Ass. 23, 375

Moss, M. O., F. V. Robinson and A. B. Wood (1967): Observations on the structure from Penicillium rubrum. Chemy. Ind. 755 - 757

Moss, M. O., F. V. Robinson, A. B. Wood, H. M. Paisley and J. Feeney (1968 a): Rubratoxin B a proposed structure for a bis-anhydride from Penicillium rubrum STOLL. Nature (Lond.) 220, 767 - 770

Moss, M. O., F. V. Robinson and A. B. Wood (1968 b): Rubratoxin, a toxic metabolite of Penicillium rubrum. Chemy. Ind. 587 - 588

Moss, M. O., A. B. Wood and F. V. Robinson (1969): The structure of rubratoxin A, a toxic metabolite of Penicillium rubrum. Tetrahedron Letters 5, 367 - 370

Nabney, J., M. B. Burbage, R. Allcroft and G. Lewis (1966): Metabolism of aflatoxin in sheep. Food Cosmet. Toxicol. 4, 475

National Academy of Sciences, National Research Council (1966): Toxicants occurring naturally in foods. Publ. 1354 Washington, D. C.

Natori, S., S. Sakaki, H. Kurata, S. Udagawa, M. Ichinol, M. Saito, M. Uneda and K. Ohtsubo (1970): Production of rubratoxin B by Penicillium purpurogenum STOLL. Appl. Microbiol. 19, 613 - 617

Nel, W. and I. F. H. Purchase (1968): Note the fate of ochratoxin A in rats. J. S. Afr. Chem. Inst. 21, 87 - 90

Nesbitt, B. F., J. O'Kelly, K. Sargeant and A. Sheridan (1962): Toxic metabolites of Aspergillus flavus. Nature (Lond.) 195, 1062 - 1063

Nesheim, S. (1964): Mycotoxins: studies of the rapid procedure for aflatoxin in peanuts, peanut meal and peanut butter. J. Ass. off. Anal. Chem. 47, 1010 - 1017

Nesheim, S. (1967): Note on ochratoxin. J. Ass. off. analyt. Chem. 50, 370 - 371

Nesval, J., H. Bösenberg und U. Linzel (1970): Untersuchungen über die Aflatoxinwirkung auf Bakterien. Arch. Hyg. Bakt. 154, 143 - 147

Newberne, P. M., G. N. Wogan, W. W. Carlton and M. M. Abdel-Kader (1964): Histopathologic lesions in ducklings caused by Aspergillus flavus cultures, culture extracts and crystalline aflatoxins. Toxicol. appl. Pharmacol. 6, 542 - 556

Newberne, P. M. and W. H. Butler (1969): Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: A review. J. Cancer Res. 29, 236 - 250

Newberne, P. M., D. H. Harrington and G. N. Wogan (1966): Effects of cirrhosis and other liver insults on induction of liver tumors by aflatoxin in rats. Lab. Invest. 15, 962 - 969

Ong, T. (1970): Mutagenicity of aflatoxins in Neurospora crassa. Mutation Res. 9, 615 - 618

Parrish, F. W., B. J. Willey, E. G. Simmons and L. Long, Jr. (1966): Production of aflatoxins and kojic acid by species of Aspergillus and Penicillium. Appl. Microbiol. 14, 139

..., J. C., B. Doupnik and O. H. Jones (1971): Acute toxicity of ochratoxins A and B in chicks. Appl. microbiol. 21, 492 - 494

Platt, B. S., R. J. C. Stewart and S. R. Gupta (1962): The chick embryo as a test organism for substances in food. Proc. Nutr. Soc. 21

Pohland, A. E., M. E. Cushmac and P.J. Andrellos (1968): Aflatoxin B hemiacetal. J. Ass. off. analyt. Chem. 51, 907

Pons, W. A., A. F. Cucullu, L. S. Lee, J. A. Robertson, A. O. Franz and L. A. Goldblatt (1966): Determination of aflatoxins in agricultural products: use of aqueous acetone for extraction. J. Ass. off. analyt. Chem. 49, 554 - 562

Purchase, I. F. H. and W. Nel (1967): Recent advances in research on ochratoxin Part 1, Toxicological aspects. In R. I. Mateles and G. N. Wogan.Biochemistry of some foodborne microbial toxins M. I. T. Press, Cambridge pp. 193 - 198

Purchase, I. F. H. and J. J. Theron (1968): The acute toxicity of ochratoxin A to rats. Food Cosmet. Toxicol. 6, 473 - 483

Purchase, I. F. H. and J. J. van der Watt (1968): Carcinogenicity of sterigmatocystin. Food Cosmet. Toxicol. 6, 555 - 556

Purchase, I. F. H. and J. J. van der Watt (1969): Acute toxicity of sterigmatocystin to rats. Food Cosmet. Toxicol. 7, 135 - 139

Put, H. M. C. and J. Th. Krniswijk (1964): Disintegration and organoleptic deterioration of processed strawberries caused by the mould Byssochlamys nivea. J. appl. Bact. 27, 53 - 58

Rabie, C. J., M. Terblanche, J. D. Smit and W. A. De Klerk (1967): Toxicity of Aspergillus wentii WEHMER. S. Afr. J. Agric. Sci. 8, 875 - 880

Rabie, C. J. and M. Terblanche (1967): Influence of temperature on the toxicity of different isolates of Aspergillus wentii WEHMER. S. Afr. J. Agric. Sci. 10, 263 - 266

Raistrick, H. and G. Smith (1933): Studies in the biochemistry of microorganisms. The metabolic products of Byssochlamys fulva OLLIV. and SMITH. J. Biochem. 27, 1814 - 1819

Raj, H. G., R. Shankaran and T. A. Venkitasubramanian (1970): Metabolic effects of aflatoxin in one day old chicks. Indian J. Biochem. 7, 55 - 56

Rao, V. N. V., K. Valmikinathan and N. Verghese (1968): Binding of aflatoxin by plasma albumin in vitro. Biochim. biophys. Acta 165, 288 - 289

Rehm, H. J. (1967 a): Mykotoxine und ihre Bedeutung für die Lebensmittelchemie. Dt. Lebensmittelrundschau 63, 269 - 272

Reiss, J. (1969): Gefährliche Stoffwechselproduzenten von Pilzen auf Futter und Nahrungsmitteln. Naturwiss. Rd. 22, 203 - 208

Ridgway, L. P. and D. A. Karnofsky (1952): The effects of metals on the chick embryo; toxicity and production of abnormalities in development. Ann. N. Y. Acad. Sci. 55, 203 - 215

Roberts, J. and P. Wooliven (1970): Studies in mycological chemistry. Part XXII. Synthesis of ochratoxin A, a metabolite of Aspergillus ochraceus wILH. J. Chem. Soc. 2, 278 - 281

Robinson, A. B., K. F. Mauly, M. P. Anthony, J. F. Catchpool and L. Pauling (1965): Anaesthesia of Artemia larvae. Method for quantitive study. Science 149, 1255 - 1258

Robertson, J. A., D. J. Teunisson and G. J. Boudreaux (1970): Isolation and structure of a biologically reduced aflatoxin B_1. J. Agr. Food Chem. 18, 1090 - 1091

Rodricks, J. V., E. Lustig, A. D. Campbell and L. Stoloff (1968): Aspertoxin, a hydroxy derivate of o-methylsterigmatocystin from aflatoxin producing cultures of Aspergillus flavus. Tetrahedron Letters 25, 2975 - 2978

Rodricks, J. V., K. R. Henery-Logan, A. D. Campbell, L. Stoloff and M. J. Verrett (1968): Isolation of a new toxin from cultures of Aspergillus flavus. Nature (Lond.) 217, 668

Sakaka, J. (1891): Toxicological studies on mouldy rice. Report I. J. Tokyo Med. Soc. 5, 1097

Sargeant, K., J. O'Kelly, R. B. A. Carnaghan and R. Allcroft (1961 a): The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. Vet. Rec. 73, 1219 - 1222

Sargeant, K., A. Sheridan, J. O'Kelly and R. B. A. Carnaghan (1961 b): Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature (Lond.) 192, 1096 - 1097

Sargeant, K., R. B. A. Carnaghan and R. Allcroft (1963): Toxic products in groundnuts. Chemy. Ind. 53 - 55

Savel, H., B. Forsyth, W. Schaeffer and Ph. Cardella (1970): Effect of aflatoxin B_1 upon phytohaemagglutinin transformed human lymphocytes. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 134, 1112 - 1115

Schmidt, J. und H. J. Rehm (1968): Mykotoxine in Lebensmitteln. Bestimmung von Byssochlaminsäure. Zschr. Lebensmittelunters. 139, 20 - 22

Schmidt, J. und H. J. Rehm (1970): Mykotoxine in Lebensmitteln IV. Mitt. Wirkung von Byssochlaminsäure, Aflatoxin B_1 und Luteokyrin auf einige Enzyme. Zbl. Bakt. II. 125, 520 - 524

Schoental, R. (1961): Liver changes and primary liver tumor in rats given toxic guinea pig diet. Brit. J. Cancer 15, 812 - 815

Schoental, R. and A. F. White (1965): Aflatoxins and albinism in plants. Nature (Lond.) 205, 57 - 58

Schoental, R. (1967): Aflatoxins. Ann. Rev. Pharmacol. 7, 343 - 356

Schroeder, H. W. and M. J. Verrett (1969): Production of aflatoxin by Aspergillus wentii WEHMER. Canad. J. Microbiol. 15, 895 - 898

Schuller, P. L., C. A. H. Verhülsdonk und W. E. Paulsch (1970): Bestimmung von Aflatoxin B_1 durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie mit fluorodensitometrischer Auswertung. Arzneimittelforschung 20, 1517 - 1519

Schultz, J. und R. Motz (1967): Toxinbildende Aspergillus flavus Stämme in Futtermitteln. Arch. exper. Vet. Med. 21, 129 - 140

Scott, B. De (1965): Toxigenic fungi isolated on cereal and legume products. Mycopath. Mycol. appl. 25, 213 - 222

Scott, P. M. and T. B. Hand (1967): Method for the detection and estimation of ochratoxin A in some cereal products. J. Ass. off. analy. Chem. 50, 366 - 370

Scott, P. M., W. van Walbeek and J. Forgacs (1967): Formation of aflatoxin by Aspergillus ostinanus WEHMER. Appl. Microbiol. 15, 945

Scott, P. M. and E. Somers (1969): Biological active compounds from field fungi. J. Agr. Food Chem. 17, 430 - 436

Scott, P. M., J. W. Lawrence and W. van Walbeek (1970): Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: Application to screening of fungal extracts. Appl. Microbiol. 20, 839 - 842

Searcy, J. W., N. D. Davis and U. L. Diener (1969): Biosynthesis of ochratoxin A. Appl. Microbiol. 18, 622 - 627

Senser, F. und H.-J. Rehm (1965): Über das Vorkommen von Schimmelpilzen in Fruchtsäften. Dt. Lebensmittelrundschau 61, 184 - 186

Senser, F., H.-J. Rehm und H. Wittmann (1967 a): Zur Kenntnis fruchtsaftverderbender Mikroorganismen. I. Vorkommen von Mikroorganismen (besonders Schimmelpilzen) in verschiedenen Fruchtsaftarten. Ind. Obst und Gemüseverwertg. 52, 175 - 178

Senser, F., H.-J. Rehm und E. Rautenberg (1967 b): Zur Kenntnis fruchtsaftverderbender Mikroorganismen. II. Schimmelpilzarten in verschiedenen Fruchtsäften. Zbl. Bakt. II., 121, 736 - 746

Shah, V. K., F. Matsumara and S. G. Knight (1968): Fungal toxins against larvae of the yellow-fever mosquito Aedes aegypti. J. invertebr. Path. 11, 146 - 148

Shank, R. C. and G. N. Wogan (1966): Acute effects of aflatoxin B_1 in liver composition and metabolism in the rat and duckling. Toxicol. appl. Pharmacol. 9, 468 - 476

Shibko, S. I., D. L. Arnold, J. Morningstar and L. Friedman (1968): Studies on the effect of aflatoxin B_1 on the development of the chick embryo. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 127, 835 - 838

Shotwell, O. L., C. W. Hesseltine and M. L. Goulden (1969): Note on the natural occurence of ochratoxin A. J. Ass. off. analyt. Chem. 52, 81 - 83

Sigg, H. P., R. Mauli, E. Flury und D. Hauser (1965): Die Konstitution von Diacetoxyscirpenol. Helv. Chim. Acta 48, 962 - 988

Sinnhuber, R. O., J. H. Wales, R. H. Engebrecht, D. F. Amend, W. D. Kray, J. L. Ayres and W. E. Ashton (1965): Aflatoxins in cottenseed meal and hepatoma in rainbow trout. Fed. Proc. 24, 627

Smith, R. H. (1963): The influence of toxins of Aspergillus flavus on the incorporation of C^{14} Leucine into proteins. J. Biochem. 88, 50 - 51

Smith, R. H. (1965): The inhibition of aminoacid activation in liver and Escherichia coli preparations by aflatoxin in vitro. J. Biochem. 95, 43 - 44

Smith J. W. and P. B. Hamilton (1970): Aflatoxicosis in the broiler chicken. Poult. Sci. 49, 207 - 215

Smith, S. J., C. W. Weber and B. L. Reid (1970): The effect of injection of chlorionated hydrocarbon pesticides on hatchability of eggs. Toxicol. appl. Pharmacol. 16, 179 - 185

Sorensen, W. G., C. W. Hesseltine and O. L. Shotwell (1967): Effect of temperature on production of aflatoxin on rice by Aspergillus flavus. Mycopath. Mycol. appl. 32, 49 - 55

Spensley, P. C. (1963): Aflatoxin, das Gift der Truthahn Krankheit. Endeavour 22, 75 - 79.

Stack, M. and J. V. Rodricks (1971): Method for analysis and chemicals confirmation of sterigmatocystin. J. Ass. off. analyt. Chem. 54, 86 - 90

Stähelin, H., M. E. Kalberer Rüsch, E. Signer und S. Lazary (1968): Über einige biologische Wirkungen des Cytostatikum Diacetoxyscirpenol. Arzneimittelforschung; 18, 989 - 994

Steyn, P. S. and R. J. van der Merwe (1966): Detection and estimation of ochratoxin A. Nature (Lond.), 211, 418

Steyn, P. S. and C. W. Holzapfel (1967): The synthesis of ochratoxin A and B, metabolites of Aspergillus ochraceus WILH. Tetrahedron Letters 23, 4449 - 4461

Staron, T., C. Allard, Nguyen Dat Xuong, M. M. Chambre, H. Grabowski and A. Kollmann (1965): Isolément de trois substances toxiques à partir des jus de culture et du mycelium d un Aspergillus ochraceus. Phytiatrie - Phytopharmacie. t. XIV p. 73 - 79

Steyn, P. S. (1969): The separation and detection of several mycotoxins by thin-layer chromatography. J. Chromato. 45, 473 - 475

Stoloff, L. (1971): Report on Mycotoxins. J. Ass. off. analyt. Chem. 54, 305 - 309

Stoloff, L., S. Nesheim, L. Yin, J. V. Rodricks, M. Stack, and A. D. Campbell (1971): A multimycotoxindetection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. J. Ass. off. analyt. Chem. 54, 91 - 97

Strzelecki, E., H. S. Lillard and J. C. Ayres (1969): Country coured ham as a possible source of aflatoxin. Appl. Microbiol. 18, 938 - 939

Sullman, S. F., S. - J. Armstrong, A. J. Zuckerman and K. R. Rees (1970): Futher studies on the toxicity of aflatoxin on human cell cultures. Brit. J. exper. Path. 51, 314 - 316

Svoboda, D., H. J. Grady and J. Higginson (1966): Aflatoxin B_1 injury in the rat and monkey liver. Amer. J. Path. 49, 1023

Taber, R. A. and H. W. Schroeder (1967): Aflatoxin producing potential of isolates of the Aspergillus flavus oryzae group from peanuts (Arachis Hypogaea). Appl. Microbiol. 15, 140 - 144

Teunisson, D. J. and J. A. Robertson (1967): Degradation of pure aflatoxin by Tetrahymena pyriformis. Appl. Microbiol. 15, 1099 - 1103

Theodossiades, G. (1963): Le caneton, réactif biologique pour le dépistage de la toxicité des tourteaux d'arachide (a biological assay using the duckling to determine the toxicity of groundnut cake). Rev. d Elevage Med. Vet. Pays Trop. 16, 229 - 236

Theron, J. J., K. J. van der Merwe, N. Liebenberg, H. J. B. Joubert and W. Nel (1966): Acute liver injury in ducklings and rats as a result of ochratoxin poisoning. J. Path. Bact. 91, 521 - 529

Townsend, R. J., O. M. Moss and H. M. Peck (1966): Isolation and characterization of hepatoxins from Penicillium rubrum. J. Pharm. Pharmacol. 18, 471 - 473

Townsley, P. M. and E. G. Lee (1967): Response of fertilized eggs of the mollusk Bankia setacea to aflatoxin. J. Ass. off. analyt. Chem. 50, 361 - 363

Ueno, Y.(1970): Toxicological and biological properties of fusarenon X, a cytotoxic mycotoxin of Fusarium nivale Fn 2 B. Symp. on Mycotoxins in Human Health, Pretoria, Südafrika, 2. - 4. Sept.

Ungar, H. and A. Z. Joffe (1969): Acute liver lesions resulting from percutaneus absorption of aflatoxins. Path. Microbiol. 33, 65 - 76

Verrett, M. J. and J. Jr., Mc Laughlin (1963): Use of the chick embryo technique in the evaluation of the toxicity of drugs. Fed. Proc. 22, 168

Verrett, M. J. and M. K. Mutchler (1964): Teratogenic effects of antibioties in the chick embryo. Fed. Proc. 23, 105

Verrett, M. J., J. - P. Marliac and J. Jr.,Mc Laughlin (1964): Use of the chicken embryo in the assay of aflatoxin toxicity. J. Ass. off. analyt. Chem. 47, 1003 - 1006

Vorster, L. J. (1969): A method for the analysis of cereals and groundnuts for three mycotoxins (aflatoxin, ochratoxin, sterigmatocystin). Analyst 94, 136 - 142

Walbeek, W.,van, P. M. Scott and J. S. Thatcher (1968): Mycotoxins from food borne fungi. Canad. J. Microbiol. 14, 131 - 137

Walbeek, W., van, P. M. Scott, J. Harwig and J. W. Lawrence (1969): Penicillium viridicatum WESTLING: a new source of ochratoxin A. Canad. J. Microbiol. 15, 1281 - 1285

Walker, M. E. (1967): Distribution of the chemicals injected into fertile eggs and its effect upon appared toxicity. Toxicol. appl. Pharmacol. 10, 290 - 299

Watt, J. J. van der, and I. F. H. Purchase (1970): Subacute toxicity of sterigmatocystin to rats. S. Afr. Med. J. 44, 159 - 160

Watt, J. J. van der and I. F. H. Purchase (1970): The acute and chronic toxicity of sterigmatocystin. Symp. on Mycotoxins in Human Health, Pretoria, Südafrika 2. - 4. Sept.

Watt, J. J. van der and I. F. H. Purchase (1970): The acute retrorsine, aflatoxin and sterigmatocystin in vervet monkeys. Brit. J. exper. Path. 51, 183 - 190

Wei, R. D., S. S. Lee and G. X. Lin (1970): Uptake of aflatoxin B_1 by the skin of rats. Experientia 26, 82 - 83

Wilson, B. J. and Ch. H. Wilson (1962 a): Hepatotoxic substances from Penicillium rubrum. J. Bact. 83, 693

Wilson, B. J. and Ch. H. Wilson (1962 b): Extraction and preliminary characterization of a hepatoxic substance from cultures of Penicillium rubrum. J. Bact. 84, 283 - 290

Wilson, B. J., T. C. Campbell, A. W. Hayes and R. T. Hanlin (1968): Investigation of reported aflatoxin production outside the Aspergillus flavus group. Appl. Microbiol.

Wogan, G. N. (1965): Mycotoxins in experimental toxicity and carcinogenicity of aflatoxins. In Wogan, G. N. Mycotoxins in foodstuffs M. I. T. Press, Cambridge, Mass. 163 - 173

Wogan, G. N. (1966): Chemical structure and biological effects of the aflatoxins. Bact. Rev. 30, 460 - 470

Wragg, J. B., V. Childs Ross and M. S. Legator (1967): Effect of aflatoxin B_1 on the deoxyribonucleic acid polymerase of Escherichia coli. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 125, 1052 - 1055

Wunder, W. und H. Otto (1969): Aflatoxin als Ursache des Leberkrebses der Forelle. Naturwissenschaften 56, 352 - 355

Yates, S. G., H. L. Tookey, J. J. Ellis, W. H. Tallent and I. A. Wolff (1969): Mycotoxins as a possible cause of fescue toxicity. J. Agr. Food Chem. 17, 437 - 442

Mein Dank gilt Frau Professor Dr. B. Gedek
für die Überlassung des Themas sowie für
die mir gewährte Unterstützung und Beratung
bei der Zusammenstellung und Interpretation
der Ergebnisse meiner Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 20. Juni 1944 wurde ich, Johanna Behringer, als Tochter des Tierarztes Dr. Hans Behringer und seiner Ehefrau Maria, geb. Rothenbucher, in München geboren.

Nach der Einschulung in München im Herbst 1950 besuchte ich zunächst vier Jahre lang die Volksschule an der Turnerstraße und im Anschluß daran das Mädchenrealgymnasium der Armen Schulschwestern. Hier legte ich im Sommer 1963 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1963/64 begann ich an der Pädagogischen Hochschule München das Studium und wechselte im Sommersemester 1964 zur Tierärztlichen Fakultät über. Das Studium der Tiermedizin schloß ich ohne Universitätswechsel im Wintersemester 1969 mit dem tierärztlichen Staatsexamen ab.

Die Praktikantenzeit leistete ich am Städtischen Schlacht- und Viehhof, München, in der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München und in einer kurativen Tierarztpraxis in München, ab.

Am 25. Mai 1970 erhielt ich die Bestallung als Tierärztin.

In der Zeit vom 1. April 1970 bis Ende Oktober 1970 arbeitete ich an dem experimentellen Teil vorliegender Dissertation.

Seit dem 1. November 1970 bin ich im Institut für Blutgruppen- und Resistenzforschung, München , beschäftigt.